

ZUR KINETIK LYMPHATISCHER ZELLEN  
BEI PATIENTEN MIT MALIGNEN  
NICHT LYMPHATISCHEN ERKRANKUNGEN

Quantitative Charakterisierung von  
Lymphozyten-Speichern und Migrationsströmen  
sowie Neubildung und Umsatz  
mit Hilfe Autoradiographischer Untersuchungen

Marianne Matzner

1976



Aus der I. Medizinischen Abteilung  
des Städtischen Krankenhauses München - Schwabing  
Chefarzt: Prof. Dr. H. Begemann

---

ZUR KINETIK LYMPHATISCHER ZELLEN BEI PATIENTEN MIT  
MALIGNEN NICHT LYMPHATISCHEN ERKRANKUNGEN:

QUANTITATIVE CHARAKTERISIERUNG VON LYMPHOZYTEN -  
SPEICHERN UND MIGRATIONSSTRÖMEN SOWIE NEUBILDUNG  
UND UMSATZ MIT HILFE AUTORADIOGRAPHISCHER UNTER-  
SUCHUNGEN

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Marianne Matzner

aus

München

München

1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der

Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Begemann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.7.1976



## INHALTSÜBERSICHT

### EINLEITUNG

#### TEIL I: S. 1

M i g r a t i o n s k i n e t i k   u n d  
Z e l l s p e i c h e r a n a l y s e   v o n  
Lymphozyten bei zwei Patienten mit soliden  
Tumoren und einer Patientin mit progressiver  
Sklerodermie

Patienten und Methode S. 7

Ergebnisse S. 12

Diskussion S. 19

Methodische Störfaktoren und  
ihre Elimination S. 27

Weitere Ergebnisse nach Eli-  
mination der Störfaktoren S. 33

Diskussion der Ergebnisse nach  
Elimination der Störfaktoren S. 36

#### TEIL II:

U m s a t z k i n e t i k   v o n   L y m p h o z y t e n   b e i  
einer Patientin mit solidem Tumor

Patientin und Methode S. 42

Ergebnisse S. 45

Diskussion S. 52

#### TEIL II:

G e s a m t d a r s t e l l u n g   d e r  
Lymphozytenkinetik beim hämatologischen Normal-  
patienten S. 60

ZUSAMMENFASSUNG S. 70

LITERATURVERZEICHNIS S. 72

Digitized by the Internet Archive  
in 2026

## EINLEITUNG

Als Grundlage der klinischen Differenzierung und Beurteilung von Erkrankungen des Blutzellsystems können auch heute noch die Kriterien der histomorphologischen und zytomorphologischen Veränderungen dieses Systems angesehen werden. Auf der Suche nach pathophysiologischen Zusammenhängen vor allem bei malignen Systemerkrankungen wurden jedoch schon vor Jahren die Grenzen der morphologischen Betrachtung erkannt, so daß neue Wege beschritten werden mußten. Gerade hinter dem zytomorphologischen Begriff "Lymphozyt" verbirgt sich ein breites Spektrum von Zellen, die sich in bezug auf Herkunft, Funktion, Lebensdauer und Verteilung innerhalb des lymphatischen Systems wesentlich voneinander unterscheiden (4, 20). Diese Heterogenität der lymphatischen Zellen und die dadurch bedingte Vielfalt krankhafter Störungen zwangen zur Entwicklung neuer Verfahren, die eine weitere Differenzierung z.B. auf biochemischer und immunologischer Basis erlaubten. Darüber hinaus haben sich Untersuchungsmethoden bewährt, die eine Charakterisierung der vielschichtigen **Z e l l k i n e t i k** des lymphatischen Systems ermöglichen. Dieser übergeordnete Begriff umfaßt die Teilbereiche Proliferations-, Umsatz- und Migrationskinetik. Im einzelnen gibt die Proliferationskinetik Auskunft über Zykluszeiten und Neubildung von Zellen im proliferierenden Gewebe, die Umsatzkinetik charakterisiert die Erneuerung lymphatischer Zellen, ihre mittlere Lebensdauer und Elimination, die Migrationskinetik schließlich beschreibt das für Lymphozyten spezifische Phänomen der Rezirkulation und der Verteilung in verschiedenen Zellspeichern.

Alle drei Teilbereiche bilden heute einen festen Bestandteil in der Erforschung lymphatischer Systemerkrankungen. So konnte z.B. das Verständnis für die Entwicklung der peripheren Lymphozytenzahlen bei chronischer lymphatischer Leukämie und Morbus Hodgkin durch die gewonnenen zellkinetischen Befunde wesentlich erweitert werden (58, 68).

Um jedoch beurteilen zu können, ob ein Parameterwert von der Norm abweicht, sind entsprechende Kenntnisse über das normale lymphatische System notwendig. Da bisher nur sehr wenige zellkinetische Untersuchungen beim hämatologischen Normalpatienten vorhanden sind, ist eine befriedigende Definition des "Normalen" nicht gegeben. Rückschlüsse von tierexperimentell gewonnenen Daten, die in großer Anzahl vorliegen, sind problematisch und erlauben keine exakte Interpretation qualitativer und quantitativer Veränderungen. Es war deshalb unser Ziel, durch Erarbeitung migrations- und umsatzkinetischer Vergleichswerte die Kenntnisse über die normale Lymphozytenkinetik zu erweitern. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß die von uns untersuchten Patienten, mit einer Ausnahme, infauste solide Tumoren aufwiesen, der Begriff "normal" also lediglich das Fehlen einer hämatologischen Erkrankung anzeigt.

Bei der Wahl der Methode für die migrationskinetischen Untersuchungen, die im Teil I dieser Arbeit abgehandelt werden, standen grundsätzlich drei Möglichkeiten zur Verfügung:

- 1) Retransfusion von in vitro radioaktiv markierten Blutlymphozyten und anschließende Beobachtung der Konzentration markierter Zellen bzw. Messung der Aktivität im Blut über die Zeit (Verdünnungsmethode) (6, 16, 19, 32, 67).
- 2) Retransfusion von markierten Zellen und Drainage des Ductus thoracicus (8, 53).
- 3) Verfolgung von Lymphozyten mit Chromosomenaberrationen, verursacht durch extrakorporale Bestrahlung des Blutes (17).

Da die Voraussetzungen für eine der beiden letztgenannten Methoden bei unseren Patienten nicht gegeben, also weder Ductusdrainage noch extrakorporale Bestrahlung des Blutes indiziert oder zumutbar waren, wurden unsere Versuche nach der Verdünnungsmethode durchgeführt.

Als Markierungssubstanz wurde das tritiierte Nukleosid Cytidin verwendet, der Nachweis des inkorporierten  $^3\text{H}$ -Cytidins erfolgte durch zytoautoradiographische Auswertung von Zellkonzentratsausstrichen. Dieses Verfahren bietet gegenüber der  $^{51}\text{Cr}$ -Markierung mit nachfolgender szintigraphischer Aktivitätsmessung des Blutes (32) folgende Vorteile:

- 1) Es handelt sich um eine physiologische Markierungssubstanz, da Cytidin einen normalen Bestandteil des Nukleinsäurenstoffwechsels darstellt.

- 2) Eventuell schädliche Wasch- und Zelltrennungsprozeduren sind nicht nötig
- 3) Es besteht die Möglichkeit der morphologischen Differenzierung
- 4) Die Kontrolle über die Markierungsintensität der Einzelzelle durch autoradiographische Auswertung läßt eine Unterscheidung zwischen Abstrom markierter Zellen und Markierungsverlust zu

Bei der Untersuchung von Neubildung und Umsatz von Blutlymphozyten, deren Ergebnisse in Teil II der vorliegenden Arbeit beschrieben werden, existiert zu der von uns verwendeten Methode bisher keine vollwertige Alternative.

Das Prinzip dieser Methode ist die stabile Kennzeichnung aller neugebildeten Zellen über einen definierten Zeitraum. Dies wird erreicht durch kontinuierliche Infusion des mit Tritium markierten spezifischen DNS-Bausteines Thymidin, der von allen DNS-synthetisierenden Zellen aktiv inkorporiert und an die Tochterzellen weitergegeben wird. Somit erhalten alle neugebildeten Lymphozyten auf indirektem Weg eine stabile DNS-Markierung und können autoradiographisch nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden (11, 68).

Im Gegensatz zu anderen Verfahren, wie die Ermittlung von Lymphozytenüberlebenszeiten durch Verfolgung von Chromosomenaberrationen nach Strahlentherapie (9, 46), erfaßt die hier verwendete Methode nicht nur Teilaspekte,

sondern alle umsatzkinetisch wichtigen Daten. Ausgehend von diesen Daten und den in Teil I erarbeiteten migrationskinetischen Befunden haben wir versucht, eine in sich geschlossene Darstellung der Lymphozytenkinetik beim hämatologischen Normalpatienten zu geben. Diese Gesamtdarstellung bildet den Abschluß der vorliegenden Arbeit.

TEIL I:

M i g r a t i o n s k i n e t i k   u n d  
Z e l l s p e i c h e r a n a l y s e

von Lymphozyten bei zwei Patienten mit soliden  
Tumoren und einer Patientin mit progressiver  
Sklerodermie

## PATIENTEN UND METHODE

### Patienten:

Die Versuche zur Bestimmung der Migrationskinetik und zur Analyse von Zellspeichergrößen von Lymphozyten wurden an 3 Patienten vorgenommen, die über Zweck und technischen Ablauf der Experimente aufgeklärt worden waren und ihr Einverständnis dazu gegeben hatten.

### Patient M:

Bei dem 66-jährigen Patienten traten ca. 6 Monate vor Krankenhauseinweisung leichte Gewichtsabnahme, Müdigkeit und Fieber auf. Der Patient bemerkte Zunahme des Leibesumfanges und gab an, besonders unter Meteorismus gelitten zu haben. Bei Klinikaufnahme bestand Ikterus, die Leber war druckschmerzhaft und ließ sich 4 cm unter dem Rippenbogen tasten; die Milz war vergrößert. Durch Laparaskopie und Probeexcision wurde ein Gallengangscarcinom diagnostiziert. Vor Versuchsbeginn erfolgte die Gabe von Aldactone, Lasix und Hydromedin zur Ausschwemmung des bestehenden Aszites.

### Patient N:

Der 65-jährige Patient litt schon seit Jahren unter einer chronischen Bronchitis, die sich im Laufe des letzten Jahres wesentlich verschlimmerte. Starke Gewichtsabnahme, Husten, blutiger Auswurf und eine

Dyspnoe waren Anlaß zur Klinikeinweisung. Hier wurde ein inoperables Bronchialcarcinom rechts mit hämorrhagischem Pleuraerguß diagnostiziert.

Patientin S:

Die 72-jährige Patientin hatte bereits seit 5 Jahren Symptome in Form von rheumatoiden Schmerzen und anfallsweisen Durchblutungsstörungen der Finger in der Art eines Raynaud-Syndroms. Nach Diagnosestellung "progressive Sklerodermie" wurde eine 1-jährige immunsuppressive Behandlung mit Imurel, in Kombination mit Decortilen, durchgeführt.

Bei allen 3 Versuchspersonen erfolgte während der Dauer des Experiments keine Therapie.

Die wichtigsten klinischen Daten der Patienten sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Da die Versuche Aufschluß über die Lymphozytenkinetik und Zellspeichergrößen bei hämatologischen Normalpersonen geben sollen, ist es vor allem wichtig, daß sich die Leukozyten- und Lymphozytenzahlen im Normalbereich befinden (3). Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, erfüllen die hämatologischen Werte der 3 Patienten, abgesehen von einer Lymphozytopenie des Patienten M., diese Bedingung.

Tabelle I

## 1. Allgemeine klinische Daten

| Patienten | Geschlecht | Alter<br>Jahre | Größe<br>cm | Gewicht<br>kg | Dauer der<br>Symptome | Milz<br>cm unter<br>dem Ri. Bogen | Leber | Therapie                  |
|-----------|------------|----------------|-------------|---------------|-----------------------|-----------------------------------|-------|---------------------------|
| M         | männl.     | 66             | 169         | 79,5          | 6 Monate              | 4                                 | 4     | Diuretika                 |
| N         | männl.     | 65             | 157         | 48,9          | 1 Jahr                | 2                                 | -     | keine                     |
| S         | weibl.     | 72             | 160         | 60,5          | 5 Jahre               | -                                 | -     | 1 Jahr Chemo-<br>therapie |

## 2. Hämatologische Werte

| Patienten | Blutvol.<br>l     | Hb<br>g% | Hkt<br>% | Erythrozyt.<br>Mill./ $\mu$ l | Leukozyt.<br>pro $\mu$ l | Lymphozyt.<br>pro $\mu$ l |
|-----------|-------------------|----------|----------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| M         | 4,93 <sup>1</sup> | 11,1     | 24       | 3,8                           | 5114                     | 700                       |
| N         | 3,60 <sup>1</sup> | 13,7     | 35       | 5,46                          | 7004                     | 1800                      |
| S         | 4,40 <sup>2</sup> | 12,4     | 35       | 4,57                          | 7635                     | 1390                      |

<sup>1</sup> Berechnet aus Körpergewicht, Größe und Geschlecht nach NADLER (45)

<sup>2</sup> Gemessen mit der <sup>131</sup>I-J-Albumin - Methode

Methode:

1. Blutentnahme, in vitro-Markierung mit  $^3\text{H}$ -Cytidin und Autotransfusion

Jedem der 3 Patienten wurde ca. 500 ml venöses Blut entnommen und in einem sterilen Plastikbeutel<sup>1</sup>, dem 80 ml ACD-Lösung (Formula A)<sup>2</sup> zur Verhinderung der Gerinnung beigegeben war, gesammelt. Unter Einhaltung der Strahlenschutzvorschriften wurde dem Blut 1 mCi  $^3\text{H}$ -Cytidin<sup>3</sup> (mit der spezifischen Aktivität von 4,0 Ci/mMol) zugesetzt. Danach wurde das Blut im Fall M und N drei Stunden, im Fall S eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Am Ende der Inkubation wurde in allen Fällen die spezifische Aktivität des "heißen Cytidins" (=  $^3\text{H}$ -Cytidin) durch Zugabe von 100 mg nicht radioaktiven "kalten Cytidins" auf das ca. 1000-fache verdünnt. Unter Verwendung einer Druckmanschette wurde das markierte Blut mit 100 mmHg innerhalb acht Minuten autotransfundiert. Zu Beginn und am Ende der Autotransfusion wurden Blutproben direkt aus dem Beutel entnommen, aus denen der Prozentsatz der infundierten markierten Lymphozyten bestimmt wurde. Aus diesem Prozentsatz markierter Lymphozyten und der Anzahl autotransfundierter Lymphozyten kann die Absolutzahl der autotransfundierten markierten Lymphozyten ermittelt werden. Diese Zahl ist der Bezugswert für die Berechnungen der Lymphozytenverteilung im Körper anhand der Konzentration markierter Zellen im peripheren Blut.

<sup>1</sup>Fenwal Transfer Pack TA - 4, Travenol International GmbH, München, Landwehrstraße 64 a

<sup>2</sup>Biotest-Serum-Institut, Frankfurt/Main

<sup>3</sup>Radiochemical Centre, Amersham, Great Britain

## 2. Herstellung der Blutausstriche und Autoradiographie

Bei den Patienten M und N wurden unmittelbar nach Ende der Reinfusion (Zeitpunkt 0) aus der contralateralen Vene Blutproben entnommen. Dann wurden in den ersten Stunden nach Autotransfusion bei allen drei Patienten 6 Blutproben, bis zur 24. Stunde weitere 10 Blutproben, bis zum 5. Tag täglich 4 Blutproben und anschließend 1 bis 2 Blutproben täglich abgenommen. Von jeder Blutprobe wurde die Gesamtleukozytenzahl mit Hilfe eines Coulter Counter bestimmt und normale Blutausstriche zur Auswertung von Differentialblutbildern hergestellt. Dann wurde das entnommene Blut sofort mit 1 ml EDTA-Plasmagel<sup>4</sup> gemischt und nach Absedimentation der Erythrozyten der leukozytenreiche Überstand abpipettiert, mit 240 g fünf Minuten zentrifugiert und aus dem Zentrifugat Zellkonzentratausstriche angefertigt. Die Ausstriche wurden luftgetrocknet und mit 100 %-igem Methylalkohol 3 x 10 Minuten fixiert. Nach Beschichtung mit Kodak AR 10-stripping film wurden die Präparate für 255 bis 349 Tage exponiert, dann entwickelt und mit 2 %-iger Giemsa - lösung bei pH 5,75 gefärbt.

## 3. Mikroskopische Auswertung

### 3.1 Ausschaltung der unspezifischen Hintergrundmarkierung:

Bei Herstellung der Präparate muß damit gerechnet werden, daß nicht nur über markierten Zellen, sondern auch diffus verteilt, eine Schwärzung der Filmemulsion in Form von einzelnen Silberkörnchen erfolgt. Um mit

<sup>4</sup> EDTA-Plasmagellösung Volumenverhältnis 1/1:  
1,107 g EDTA + 1,4 g NaCl ad 100 ml Aqua dest. + 100 ml Plasmagel<sup>R</sup>

Plasmagel<sup>R</sup> Braun Melsungen, Melsungen BRD

Sicherheit sagen zu können, daß eine Zelle durch  $^3\text{H}$ -Cytidin markiert ist, wurden pro Präparat bei 500 Zellen alle Körnchen über Kern und Cytoplasma gezählt. Dabei wurde ermittelt, daß über dem Großteil der Zellen die Anzahl der Silberkörnchen zwischen 0 und 4 lag, nur selten 6 erreichte und keine Zellen vorhanden waren, die zwischen 7 und 9 Körnchen aufwiesen. Es wurden dann wieder in wechselnder Zahl Zellen mit 9 und mehr Körnchen gefunden - diese Zellen wurden als eindeutig markiert angesehen.

Bei der Auswertung von aktivitätsfreien Kontrollpräparaten, die genauso behandelt worden waren wie die experimentellen Präparate, wurden keine Zellen gefunden, die mehr als 6 Körnchen über Kern und Zytoplasma aufwiesen. Diese Beobachtung bestätigt die Wahl der Körnchenzahl von 9 pro Zelle zur Abgrenzung echter Markierung von der unspezifischen Hintergrundmarkierung.

### 3.2 Größenbestimmung:

Pro Präparat wurden die Kerndurchmesser von 500 Lymphozyten mit Hilfe eines Okularmikrometers ausgemessen und dabei drei Größenklassen gebildet:

|                          |                 |                           |
|--------------------------|-----------------|---------------------------|
| Kleine Lymphozyten:      | Kerndurchmesser | < 8,5 $\mu\text{m}$       |
| Mittelgroße Lymphozyten: | "               | = 8,5 - 9,9 $\mu\text{m}$ |
| Große Lymphozyten:       | "               | $\geq$ 10 $\mu\text{m}$   |

Mit Hilfe dieser Größendifferenzierung wurde der prozentuale Anteil der einzelnen Größenklassen an der Gesamtzahl der Lymphozyten bestimmt.

### 3.3 Bestimmung des Markierungsindex und der mittleren Körnchenzahl:

Bei allen drei Patienten wurden 4000 Lymphozyten pro Präparat ausgewertet. Nach der in 3.1 beschriebenen Beobachtung wurde jede Zelle, die mehr als 9 Silberkörnchen über Kern und Cytoplasma aufwies, als markiert angesehen, durch Ausmessen in die entsprechende Größenklasse eingeordnet und die genaue Anzahl der Silberkörnchen ausgezählt. Aus der Gesamtzahl der differenzierten Zellen und der markierten Lymphozyten wurde für jede Größenklasse der Markierungsindex in Prozent ermittelt.

Die mittlere Körnchenzahl wurde durch Addieren der Einzelmarkierungen und anschließendes Dividieren durch die entsprechende Anzahl markierter Zellen berechnet.

## ERGEBNISSE

### 1. Auswertung des Retransfusionsblutes nach in vitro-Markierung mit $^3\text{H}$ -Cytidin

Nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Cytidin waren 91 bis 98 % aller Lymphozyten markiert. Insgesamt wurde also die überwiegende Mehrzahl der in 500 ml Blut vorhandenen Lymphozyten als markiert retransfundierte. Für die später untersuchten kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten waren es bei Patient M  $3,55 \times 10^8$ , davon  $2,49 \times 10^8$  kleine markierte Lymphozyten, bei Patient N  $8,61 \times 10^8$  bzw.  $7,37 \times 10^8$  und bei der Patientin S  $5,84 \times 10^8$  bzw.  $3,16 \times 10^8$  (siehe Tabelle II).

Tabelle II

In vitro - Markierung mit  $^3\text{H}$ -Cytidin (Beutelwerte)

| Patienten                               | Inkubations-<br>dauer | Kleine Lymphozyten |                                   |   |                                                                   |     |                                   |                                                                      |     |
|-----------------------------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------------------|---|-------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-----|
|                                         |                       | h                  | Markierungs-<br>index<br>Körnchen | § | Anzahl der<br>markierten<br>Lymphozyten<br>$N_I$<br>$\times 10^8$ | MKZ | Markierungs-<br>index<br>Körnchen | Anzahl der<br>hochmark.<br>Lymphozyten<br>$N_{III}$<br>$\times 10^8$ | MKZ |
| M                                       | 3                     |                    | 94,0                              |   | 2,49                                                              | 60  | 68,6                              | 1,82                                                                 | 75  |
| N                                       | 3                     |                    | 94,4                              |   | 7,37                                                              | 40  | 40,1                              | 3,13                                                                 | 59  |
| S                                       | 1                     |                    | 88,1                              |   | 3,16                                                              | 40  | 33,0                              | 1,19                                                                 | 66  |
| <u>Kleine + mittelgroße Lymphozyten</u> |                       |                    |                                   |   |                                                                   |     |                                   |                                                                      |     |
| M                                       | 3                     |                    | 94,0                              |   | 3,55                                                              | 64  | 73,17                             | 2,76                                                                 | 77  |
| N                                       | 3                     |                    | 94,2                              |   | 8,61                                                              | 41  | 41,98                             | 3,84                                                                 | 67  |
| S                                       | 1                     |                    | 89,8                              |   | 5,84                                                              | 44  | 41,40                             | 2,69                                                                 | 71  |

## 2. Verhalten der markierten Zellen im zirkulierenden Blut nach Retransfusion

Abb. 1 und 2 zeigen den Prozentsatz an markierten Zellen (= MI %) und deren mittlere Körnchenzahl (= MKZ - %) im zeitlichen Ablauf des Versuches, wie sie im peripheren Blut gefunden wurden.

Bei allen drei Patienten wurde das Verhalten der kleinen und der kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten im zirkulierenden Blut nach Retransfusion betrachtet. Auf die Darstellung der großen Lymphozyten wurde verzichtet, da bei unseren Patienten ihr Anteil an der Gesamtlymphozytenzahl mit 2,8 bis 5,7 % sehr gering war und deshalb keine reproduzierbaren Ergebnisse ermittelt werden konnten. Darüberhinaus muß nach heutiger Auffassung die Mehrzahl der großen Lymphozyten als nicht-rezirkulationsfähig angesehen werden (10, 15, 17, 22, 27, 38, 53, 56, 70). Für die Migrationskinetik und Zellspeicheranalyse sind aus ihrem Verhalten keine Aufschlüsse zu erwarten.

### a) Verlauf der Markierungsindices (Abb. 1 und 2)

Bei allen drei Patienten sind ähnliche Kurvenverläufe zu beobachten. Diese gilt sowohl für die Kurven der kleinen als auch der kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten.

Fünf Minuten nach Ende der Retransfusion sind von den k l e i n e n Lymphozyten im zirkulierenden Blut etwa 0,7 bis 1,5 % markiert. Nach einem steilen Abfall der Markierungsindices innerhalb der ersten Stunde nach Autotransfusion stellt sich für kurze

Zeit ein Plateauwert ein, der bei 0,1 bis 0,3 % liegt. Der anschließende Anstieg übersteigt bei allen drei Patienten die Anfangswerte und erreicht um die 25. bis 28. Stunde einen Gipfel, dem nach erneutem Abfall ein weiterer Gipfel um die 48. bis 56. Stunde und ein dritter Gipfel um die 77. Stunde folgt. Es werden dabei Werte bis zu 2 % erreicht.

Die Kurven der k l e i n e n   p l u s   m i t t e l -  
g r o ß e n   Lymphozyten zeigen ein sehr ähnliches Muster mit fast identischen Ausgangswerten, durchschnittlich etwas höheren Plateauwerten und besonders ausgeprägten periodischen Gipfeln. Lediglich bei der Patientin S sind hier zwischen den Gipfelpunkten kürzere Abstände nachweisbar.

b) Verlauf der Markierungsintensitäten (Abb. 1 und 2)

Auch im Verlauf der Markierungsintensitäten sind die einzelnen Kurvenbewegungen bei allen drei Patienten konstant festzustellen. Als Beispiel wurde der Kurvenverlauf für Patient N in Abb. 1 und 2 dargestellt. Ausgehend von einer Markierungsintensität von ca. 100 %, die der der Beutelpräparate entspricht, steigt die Kurve bis etwa zur 4. Stunde steil an und fällt dann, gleichzeitig mit dem Anstieg der Markierungsindexkurve auf einen tiefen Wert, ebenfalls um die 28. Stunde, ab. Auch im weiteren Verlauf ist ein gegensätzliches Verhalten der Markierungsintensitäten zur Anzahl markierter Zellen im Blut zu beobachten, d.h., den Gipfelwerten der Markierungsindexkurve um die 48. und 77. Stunde sind Tiefstwerte der Markierungsintensität zuzuordnen. Die

im Blut gefundenen markierten Lymphozyten weisen also nicht durchwegs gleiche Markierungsintensitäten wie die retransfundierten Zellen auf, sondern erscheinen in den ersten Stunden zunehmend stärker markiert und zeigen im weiteren Verlauf Schwankungen, für die ein Zusammenhang mit der Anzahl markierter Zellen vermutet werden muß.

c) Halbwertszeiten des initialen Abfalls (Abb. 3)

Trägt man den initialen steilen Abfall der Markierungsexponentialkurven auf semilogarithmisches Papier auf, so ist zu erkennen, daß er einer einfachen Exponentialfunktion folgt. Aus dieser sind Halbwertszeiten des Verschwindens der markierten Lymphozyten aus der Zirkulation zu berechnen, die bei den kleinen Lymphozyten bei 14 bis 22 Minuten liegen. Die entsprechenden Halbwertszeiten für die kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten sind etwas kürzer und betragen 12 bis 21 Minuten.

Diesen Halbwertszeiten sind Bluttransitzeiten ( $= T_{1/2} / \ln 2$ ) von 20 bis 32 Minuten für die kleinen und 17,3 bis 30,3 Minuten für die kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten zuzuordnen.

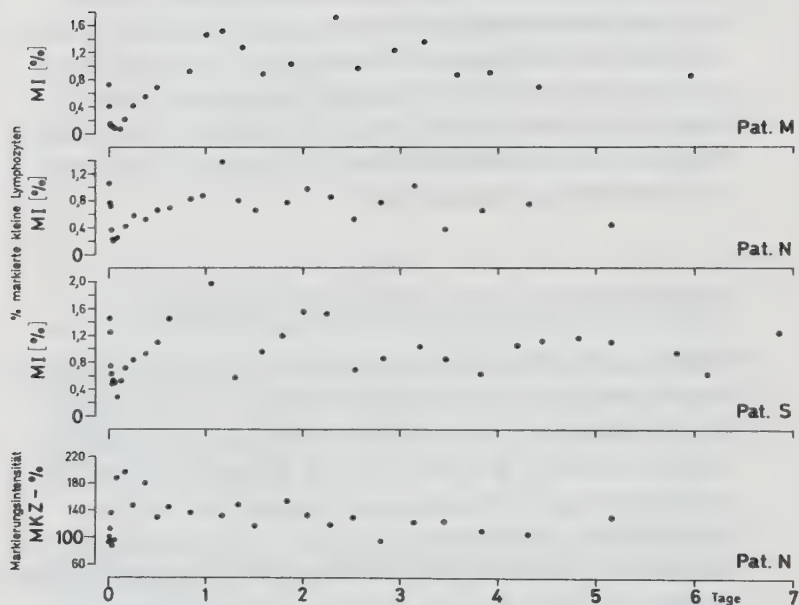


Abb. 1

oben: Zeitliche Änderung des Markierungsindex kleiner Lymphozyten, d.h., des prozentualen Anteils an kleinen Lymphozyten, die mehr als 9 Körnchen aufwiesen

unten: Zeitliche Änderung der Markierungsintensität kleiner Lymphozyten mit mehr als 9 Körnchen bei Patient N, bezogen auf die mittlere Körnchenzahl der retransfundierte markierten Lymphozyten (= 100 %)

MI = Markierungsindex

MKZ = mittlere Körnchenzahl

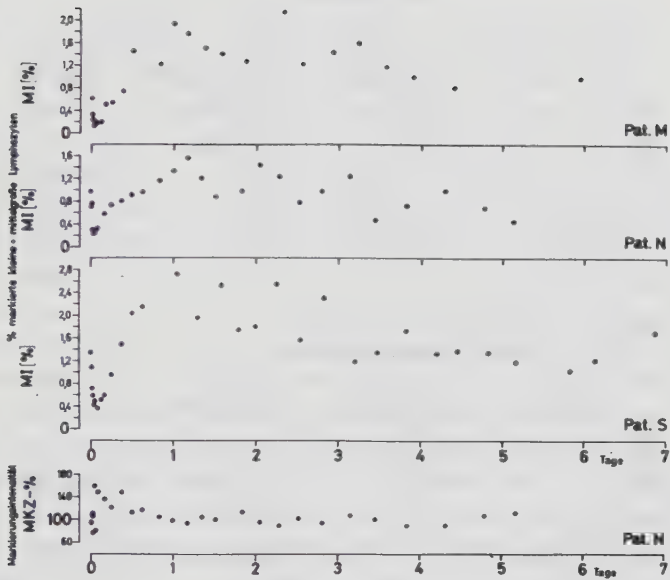


Abb. 2

oben: Zeitliche Änderung des Markierungsindex kleiner plus mittelgroßer Lymphozyten mit mehr als 9 Körnchen im Blut

unten: Zeitliche Änderung der Markierungsintensität kleiner plus mittelgroßer Lymphozyten mit mehr als 9 Körnchen

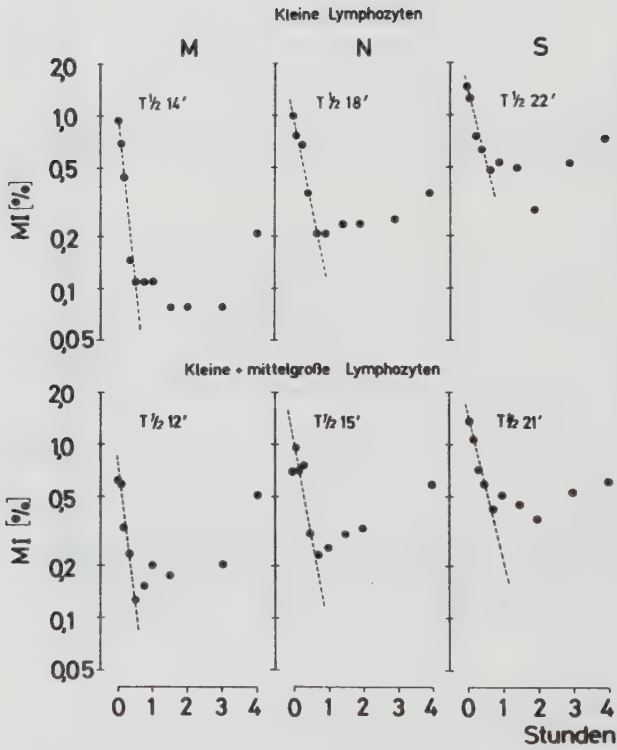


Abb. 3

Halbwertszeiten des Verschwindens markierter Lymphozyten aus dem Blut (semilogarithmische Darstellung)

## DISKUSSION

Aus dem gezeigten Verhalten in vitro markierter Lymphozyten nach Retransfusion im Blut können nach der Verdünnungsmethode wichtige Hinweise auf die Größe der einzelnen Zellspeicher, in denen sich die retransfundierten Zellen verteilen, sowie Art und Geschwindigkeit ihrer Verteilung gewonnen werden. Dabei sind, ausgehend von der jeweiligen absoluten Anzahl markierter retransfundierter Zellen ( $N_I$  in Tabelle II), folgende Überlegungen notwendig:

Nimmt man an, daß es sich bei den zirkulierenden Lymphozyten um ein geschlossenes Kompartiment handelt, in dem sich die infundierten markierten Lymphozyten gleichmäßig verteilen, so kann man aus der Größe des zirkulierenden Speichers und der Anzahl der markierten retransfundierten Zellen den Markierungsindex berechnen, den man am Ende der Autotransfusion = Zeitpunkt 0 erwarten würde ( $MI_I$  %, Tabelle III). Der tatsächlich zum Zeitpunkt 0 beobachtete M.I. ( $M.I._0$ ) ist jedoch, wie aus Tabelle III zu ersehen ist, um das 5,85- bis 11,5-fache bei den kleinen bzw. um das 6,6- bis 14-fache bei den kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten kleiner als der Markierungsindex, der zu erwarten war, wenn sich die retransfundierten Zellen im zirkulierenden Speicher verteilen. Das bedeutet, daß höchstens 1/6 der autotransfundierten markierten Lymphozyten am Ende der Retransfusion im zirkulierenden Blut wiedergefunden werden. Für den Verbleib der restlichen markierten retransfundierten Lymphozyten innerhalb der 8 Minuten während Retransfusion sind folgende Möglichkeiten zu diskutieren:

Tabelle III Verhältnis des intravasalen Speichers  
zum zirkulierenden Speicher

(berechnet aus dem raschen Abstrom markierter Zellen aus dem zirkulierenden Blut während Retransfusion)

| Patienten                                 | Anzahl von<br>Lymphozyten<br>pro $\mu$ l | Blutvolumen | Zirkulierender<br>Lymph. speicher | Markierte<br>autotransf. Lymph. | M.I. I<br>% | N <sub>I</sub> <sup>8</sup><br>x10 <sup>8</sup> | Nr<br>x10 <sup>8</sup> | ZLS <sub>9</sub><br>x10 <sup>9</sup> | Ltr. | Zum Zeitpunkt O<br>erwarteter Mark.-<br>Index im ZLS | Zum Zeitpunkt O<br>erwartete Anzahl<br>zirk. autor. mark.<br>Lymphozyten | Zum Zeitpunkt O<br>erwarteter Mark.-<br>Index im ZLS<br>(korr.) | Zum Zeitpunkt O<br>beob. Mark. Index | Verhältnis von<br>intravas. Speicher<br>zirk. Speicher |                   | Minimalwert |
|-------------------------------------------|------------------------------------------|-------------|-----------------------------------|---------------------------------|-------------|-------------------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------|-------------|
|                                           |                                          |             |                                   |                                 |             |                                                 |                        |                                      |      |                                                      |                                                                          |                                                                 |                                      | M.I. I<br>M.I. O                                       | M.I. II<br>M.I. O |             |
| Kleine<br>Lymphozyten                     | 480                                      | 4,93        | 2,35                              | 2,49                            | 10,60       | 0,46                                            | 2,03                   | 0,95 <sup>x</sup><br>(0,95)          |      | 8,64                                                 | 0,95 <sup>x</sup><br>(0,95)                                              | 8,64                                                            | 0,95 <sup>x</sup><br>(0,95)          | 11,16                                                  | 9,09              |             |
|                                           | 1520                                     | 3,60        | 5,47                              | 7,37                            | 13,47       | 1,05                                            | 6,32                   | 1,17                                 |      | 11,55                                                | 1,17                                                                     | 11,55                                                           | 1,17                                 | 11,51                                                  | 9,87              |             |
|                                           | 720                                      | 4,40        | 3,18                              | 3,16                            | 9,94        | 0,41                                            | 2,75                   | (1,03) <sup>x</sup><br>1,70          |      | 8,65                                                 | (1,03) <sup>x</sup><br>1,70                                              | 8,65                                                            | (1,03) <sup>x</sup><br>1,70          | 5,85                                                   | 5,09              |             |
| Kleine plus<br>mittelgroße<br>Lymphozyten | 681                                      | 4,93        | 3,34                              | 3,55                            | 10,63       | 0,71                                            | 2,84                   | 0,75 <sup>x</sup><br>(0,77)          |      | 8,52                                                 | 0,75 <sup>x</sup><br>(0,77)                                              | 8,52                                                            | 0,75 <sup>x</sup><br>(0,77)          | 14,18                                                  | 11,33             |             |
|                                           | 1777                                     | 3,60        | 6,40                              | 8,61                            | 13,45       | 1,41                                            | 7,20                   | 1,15 <sup>x</sup><br>(0,98)          |      | 11,25                                                | 1,15 <sup>x</sup><br>(0,98)                                              | 11,25                                                           | 1,15 <sup>x</sup><br>(0,98)          | 11,70                                                  | 9,80              |             |
|                                           | 1310                                     | 4,40        | 5,76                              | 5,84                            | 10,12       | 0,71                                            | 5,15                   | 1,54 <sup>x</sup><br>1,54            |      | 8,89                                                 | 1,54 <sup>x</sup><br>1,54                                                | 8,89                                                            | 1,54 <sup>x</sup><br>1,54            | 6,57                                                   | 5,77              |             |

x Der zum Zeitpunkt O beobachtete Markierungsindex wurde durch Extrapolation des exponentiellen Abfalles auf die Null-Linie gewonnen. Die eingeklammerten Werte wurden durch Blutentnahmen zum Zeitpunkt O direkt bestimmt.

1. Läsion der Zellen durch Radiotoxizität und Retransfusionsprozedur mit nachfolgender rascher Elimination aus dem Blut
2. Markierungsverlust
3. Rasches Abströmen von Zellen ins Gewebe
4. Verdünnung der retransfundierte Zellen in einem intravasalen Speicher, der größer ist als der zirkulierende Speicher und/oder ungleichmäßige intravasale Verteilung durch Sequestration von markierten Zellen in Geweben wie Milz, Leber und Lunge.

Nach den bisherigen Angaben in der Literatur findet bei der von uns angewandten Methode praktisch keine Zerstörung von Zellen statt. Hersey (32), der unter Verwendung der unphysiologischen  $\text{Cr}^{51}$  - Markierung und eingreifender Zellseparationsmethoden entsprechende Untersuchungen anstellte, konnte keine Anzeichen für Zelltod in größerem Umfange feststellen. Nachdem bei unserer Methode keine Zelltrennung und Zellwaschung durchgeführt wurde, wäre noch am ehesten ein cytotoxischer Effekt durch inkorporiertes  $^3\text{H}$ -Cytidin zu diskutieren. Dies würde jedoch vor allem hochmarkierte Zellen betreffen und sich in einem Abfall der Markierungsintensität nach Retransfusion ausdrücken. Wie man aus Abb. 1 und 2 entnehmen kann, ist dies aber keineswegs der Fall. Darüberhinaus ergaben zur Kontrolle durchgeführte Trypanblau-Vitalitätstests, daß bei Retransfusion mehr als 98 % der Zellen als lebend angesehen werden können. Das verminderte Auftreten von markierten Zellen im zirkulierenden Blut nach Retransfu-

sion ist also durch Zelltod nicht zu erklären

Ebenso ist ein Markierungsverlust auszuschließen, da die Markierungsintensität in den ersten Stunden nach Retransfusion sogar ansteigt (auf dieses Phänomen wird an anderer Stelle noch eingegangen).

Dagegen ist als sicher anzunehmen, daß zumindest rezirkulationsfähige markierte Lymphozyten bereits während der Retransfusion das Blut verlassen und vor allem ins lymphatische Gewebe abströmen. Nimmt man an, daß sie dies mit der gleichen Halbwertszeit wie nach Retransfusion tun (siehe dort), so muß der erwartete Markierungsindex zum Zeitpunkt 0 entsprechend korrigiert werden. Lineare Einstromrate durch kontinuierliche Retransfusion der markierten Zellen (innerhalb von 8 Minuten) und gleichzeitiger exponentieller Ausstrom ins Gewebe werden durch die folgende mathematische Formel erfaßt, wobei als  $t$  die Retransfusionsdauer von 8 Minuten, als  $T_{1/2}$  die definierten Halbwertszeiten nach Retransfusion, die aus den Kurven entnommen wurden, und als Abstromkoeffizient  $\lambda \ln 2 / T_{1/2}$  eingesetzt werden.

$$N_{II} = \frac{N_I}{t \times \lambda} (1 - e^{-\lambda t})$$

Als Ergebnis dieser Berechnung erhält man mit  $N_{II}$  die absolute Anzahl markierter retransfundierter Zellen, die nach Abzug der während Retransfusion ins Gewebe abgeströmten Zellen zum Zeitpunkt 0 erwartet werden muß (siehe  $N_{II}$  bzw.  $M.I._{II}$  in Tabelle III). Da bei dieser Korrektur mit  $N_I$  alle retransfundierten markierten Lymphozyten erfaßt werden, d.h., davon ausgegangen wird, daß alle retransfundierten Lymphozyten mit der bestimmten Halbwertszeit das Blut verlassen, muß der korrigierte zum Zeitpunkt 0 erwartete Wert ( $N_{II}$  bzw.  $M.I._{II}$ ) als Minimalwert angesehen werden,

wegen der unkorrigierte Wert davon ausgeht, daß keine Zelle die Zirkulation verläßt und deshalb einen Maximalwert darstellt.

Selbst unter Berücksichtigung dieser Zellen, die das Blut nach der oben genannten Formel während Retransfusion bereits verlassen haben ( = Minimalwert), beträgt der erwartete M.I. zum Zeitpunkt 0 immer noch das 5- bis 10- fache bei der kleinen bzw. das 6- bis 11- fache bei den kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten des tatsächlich beobachteten Markierungsindex. Aus diesem Grund sind die im Punkt 4 aufgeführten Phänomene als Erklärung heranzuziehen:

Ein sogenannter marginaler Zellspeicher, wie er von Athens et al. (1) für Granulozyten festgestellt wurde und der mit dem zirkulierenden Zellspeicher in ständigem raschen Austausch steht, wird heute auch für Lymphozyten als wahrscheinlich angesehen (7, 50). Die Angaben für diesen marginalen Speicher liegen allerdings etwa im Größenbereich des zirkulierenden Speichers (7, 50), so daß dieser Faktor allein als Erklärung für den bei uns beobachteten niedrigen Markierungsindex zum Zeitpunkt 0 im zirkulierenden Blut nicht ausreicht. Deshalb muß darüberhinaus eine Sequestration von Zellen in bestimmten Geweben, wobei der Milz wahrscheinlich eine wichtige Rolle zukommt, als weitere Ursache angenommen werden. Dies würde unserer eigenen Beobachtung, daß die Diskrepanz zwischen dem erwarteten und dem beobachteten Markierungsindex bei den Patienten M und N mit stauungsbedingter Splenomegalie besonders ausgeprägt ist, gut entsprechen.

Gerade bei diesen Patienten muß eine massive Umverteilung innerhalb des intravasalen Speichers mit Sequestration von Zellen in den gestauten Organen vermutet werden. Die geringe Anzahl markierter Zellen, die nach Retransfusion im zirkulierenden Blut gefunden wurde, wäre in diesen Fällen Ausdruck einer Verminderung zirkulierender Zellen überhaupt, hervorgerufen durch eine Verschiebung innerhalb des intravasalen Speichers. Diese Annahme wird durch die starke Lymphozytopenie bei Patient M bestätigt. Das Verhältnis zwischen intravasalem und zirkulierendem Speicher, das bei unseren Patienten mit 14 bis 16 zu 1 sehr hoch gefunden wurde, scheint also eine variable Größe zu sein, die unter anderem auch von der hämodynamischen Kreislaufsituation des Patienten abhängig ist.

Neben dieser Umverteilung der Speicher kann aber auch ein rasches vorübergehendes Abfangen markierter retransfundierter Zellen in Geweben wie Milz und Leber nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Dieses Phänomen, das vor allem bei Patient N zu diskutieren ist, würde zu einer echten Überschätzung der Größe des intravasalen Speichers führen. Im Gegensatz zu den Befunden von Pabst und Trepel (50), die nach 2 bis 5 minütiger Retransfusion ein extrem rasches Abfangen markierter Zellen durch die Milz und einen nachfolgenden Wiederausstoß in die Zirkulation beschreiben, konnten bei uns während der Retransfusion aus methodischen Gründen einzelne Verteilungsbewegungen nicht differenziert werden. Ob, und wenn ja, in welchem Ausmaß, das beschriebene Phänomen bei unseren Patienten zur Überschätzung der Größe des intravasalen Speichers (Tabelle III) geführt hat, kann deshalb nicht mit Sicherheit abgegrenzt werden.

Zusammenfassend kann also nur festgestellt werden, daß sich bei unseren drei hämatologischen Normalpatienten autologe markierte kleine und mittelgroße Lymphozyten während Retransfusion in einem "intravasalen Speicher" verteilt haben, der maximal 6 bis 14 mal so groß wie der zirkulierende Speicher ist. Eine wichtige Rolle der Milz für die Verteilung der markierten retransfundierte Lymphozyten ist für diese Phase zumindest zu vermuten.

Im Gegensatz zu dieser raschen intravasalen Verteilung während Retransfusion kann der aus Abb. 3 ersichtliche exponentielle Abfall nach Ende der Retransfusion als kontinuierlicher Ausstrom rezirkulierender Lymphozyten in ein extravasales Kompartiment gedeutet werden. Dieser Ausstrom, mit einer definierten Halbwertszeit von 14 - 22 Minuten bei den kleinen und 12 - 21 Minuten bei den kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten, erfolgt natürlich auch während Retransfusion, worauf bereits bei Korrektur des erwarteten Markierungsindex zum Zeitpunkt 0 hingewiesen wurde.

Die bei uns gefundenen Halbwertszeiten und die daraus berechnete mittlere Verweildauer im zirkulierenden Blut (= Bluttransitzeit) von 20 - 32 Minuten bei den kleinen und 17,3 - 30,3 Minuten bei den kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten stimmen gut mit den in der Literatur angegebenen Werten von 15 - 30 Minuten für die Halbwertszeit (32, 50), bzw. 20 - 40 Minuten für die mittlere Verweildauer (15, 17, 32, 50) überein.

Wie aus Abb. 1 und 2 weiter ersichtlich, erreicht jedoch der initiale Abfall bei allen drei Patienten nicht die Nulllinie, sondern der Markierungsindex geht zwischen ca. 45 Minuten und 3 Stunden in ein Plateau über. Das bedeutet, daß in diesem Zeitraum weiterhin eine bestimmte Anzahl von markierten autotransfundierte Zellen im zirkulierenden Blut vorhanden ist. Es bieten sich dafür drei Möglichkeiten an:

1. Markierte Zellen, die das zirkulierende Blut noch nicht verlassen haben
2. Markierte Zellen, die bereits nach Rezirkulation wieder ins zirkulierende Blut eingetreten sind und schließlich
3. Zellen, die zur Rezirkulation nicht fähig sind

Es gilt zwar als gesichert, daß zumindest bei Ratte und Maus Lymphozyten existieren (z.B. rezirkulierende B-Lymphozyten), die das Blutkompartiment mit einer wesentlich längeren Halbwertszeit, als die bei uns beschriebene, verlassen (23, 33, 64). Auch das vereinzelte Wiederauftreten von über die Milz rezirkulierten Lymphozyten kann bei der in der Literatur beschriebenen minimalen Durchgangszeit von einer Stunde durch die Milz (49) nicht ausgeschlossen werden. Der größte Teil der in diesem Zeitraum im zirkulierenden Blut vorhandenen markierten Lymphozyten dürfte jedoch aus nicht rezirkulierenden Zellen bestehen. Dieser Anteil nicht rezirkulierender Lymphozyten, geschätzt aus der Höhe des Plateaus, wird später bei der Berechnung des rezirkulierenden Speichers

zu berücksichtigen sein (siehe Tabelle IV).

Während der bisher besprochene Verlauf der Markierungsindices einschließlich Plateauphase, das Verhalten der retransfundierte markierten Zellen im Blut wiedergibt und zur Interpretation und Berechnung der Verteilungsphänomene gut geeignet ist, kann der weitere Verlauf der Kurve mit seinen überhöhten rhythmische Wellenbewegungen unter dieser Voraussetzung nicht mehr diskutiert werden. Auch das Verhalten der Markierungsintensität, die im Vergleich mit den Ausgangswerten in den ersten Stunden nach Retransfusion weiter ansteigt, bedarf einer Klärung.

Im folgenden Abschnitt wird versucht, auf die dafür verantwortlichen Störfaktoren näher einzugehen und Methoden zu finden, sie zu eliminieren, wobei sich die Überlegungen im wesentlichen auf die Arbeit von Schick et. al. (59) stützen.

#### METHODISCHE STÖRFAKTOREN UND IHRE ELIMINATION

Schick et. al. (59) stellten bei Retransfusionsversuchen an Patienten mit Morbus Hodgkin ab der 4. Stunde die gleichen Veränderungen der Markierungsindexkurven fest. Ausgehend von der Tatsache, daß die wellenförmigen rhythmischen Anstiege der Markierungsindices die dem Bild einer Thymidin - Puls - Markierung ähneln, bei einem Patienten, dem gewaschenen Lymphozyten retransfundiert wurden, gänzlich fehlten, kamen sie zu dem Schluß, daß es sich um ein Phänomen der in vivo-Reutilisation von nicht gebundenem freiem  $^3\text{H}$ -Cytidin handeln müsse. Diese Annahme wurde noch gestützt durch die Beobachtung, daß sich bei den Patienten, bei denen die Markierungsindexkurven diese Gipfelpunkte aufwiesen, die Kurven der Markierungsintensität gegenläufig verhielten und so den rhythmischen Einstrom von relativ niedrig markierten neugebildeten Zellen vermuten ließen.

Gezielte Untersuchungen, wie sie in der oben zitierten Arbeit beschrieben werden, führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Ca. 95 % der Aktivität von  $^3\text{H}$ -Cytidin liegt nach Inkubation in nicht zellgebundener Form vor und wird als solche retransfundiert. Davon können noch ungefähr  $2/3$  zur Reutilisation in vivo verwendet werden.
2. Die Infusion einer entsprechenden Menge von  $^3\text{H}$ -Cytidin führt im Versuch zur Markierung von neugebildeten Lymphozyten, die ab der 4. Stunde auf-

treten, nach 24 Stunden einen Markierungsindex von 10 % erreichen und weitere Gipfelpunkte der Markierungsindexkurve bei 2 und 3 Tagen bewirken.

3. Das in vivo in die Zellen eingebaute  $^3\text{H}$ -Cytidin ist zum größten Teil durch Perchlorsäure nicht extrahierbar, also nicht an RNS-Makromoleküle gebunden. Es handelt sich mit größter Wahrscheinlichkeit um eine DNS-Markierung.
4. Diese Utilisation von freiem  $^3\text{H}$ -Cytidin kann nur in geringem Maße durch 1000-fache Verdünnung mit unmarkiertem Cytidin, wie sie auch in unseren Versuchen vorgenommen wurde, vermindert werden.
5. Die Markierungsintensität der neugebildeten markierten Zellen liegt deutlich unter den Werten, wie sie bei den in vitro markierten retransfundierten Zellen beobachtet werden. Markierungsintensitäten von über 40 Körnchen pro Zelle werden dabei nicht erreicht.

Aus diesen Untersuchungen ergeben sich auch für unsere Arbeit folgende Konsequenzen:

Der Verlauf der Markierungsindexkurve ab ca. der

4. Stunde gibt also nicht mehr das Verhalten der retransfundierten markierten Zellen wieder, sondern ist durch das Auftreten von neugebildeten in vivo markierten Lymphozyten verfälscht. Zugleich bieten uns oben zitierte Untersuchungen eine Möglichkeit, diesen

Störfaktor zu eliminieren, indem wir in diesem Abschnitt der Kurve nur noch das Verhalten der hochmarkierten Zellen betrachten, d.h., Lymphozyten mit einer Markierungsintensität, die von neugebildeten Zellen nicht erreicht wird.

In der og. Arbeit wurde die Wirksamkeit dieser Methode ebenfalls nachgewiesen. Dabei konnte demonstriert werden, daß sich der Kurvenverlauf der markierten Zellen, die mehr als 30 Körnchen aufwiesen, grundlegend änderte und sich, unter Verlust der rhythmischen Wellenbewegungen, dem Verlauf der Kurve des Patienten, der gewaschene Lymphozyten erhalten hatte, anglich.

Eine einfache Möglichkeit, die Anwesenheit der relativ niedrig markierten neugebildeten Lymphozyten aufzuzeigen und die Körnchenschwelle zu bestimmen, ab der diese Zellen als eliminiert gelten können, stellt die Berechnung der sog. "Recovery" für verschiedene Körnchenklassen dar. Es handelt sich dabei um die Bestimmung des prozentualen Anteils an retransfundierte markierten Zellen, der zu einem definierten Zeitraum im Blut vorhanden ist (siehe Abb. 4).

Da keinerlei Anhaltspunkte dafür existieren, daß sich Zellen verschiedener Markierungsintensität in den einzelnen Kompartments unterschiedlich verteilen, müßte sich für jede Körnchenklasse jeweils der gleiche Anteil markierter retransfundierter Zellen im Blut wiederfinden, d.h., die "Recovery"-Kurve müßte eine Ge-

rade ergeben. Wie Abb. 4 zeigt, ist dies bei uns nicht der Fall. Statt dessen ist bei allen drei Patienten eine Abwärtsbewegung der Kurve auf einen niedrigsten Wert um 30 bis 40 Körnchen feststellbar. Dieser Abfall macht deutlich, daß in den niedrigen Körnchenklassen eine steigende Anzahl von neugebildeten in vivo markierten Zellen enthalten ist. Der niedrigste Wert jedoch gibt die Körnchenschwelle an, bei der praktisch keine dieser neugebildeten Zellen mehr vorhanden sind. Bei unseren weiteren Berechnungen wurde deshalb nur noch das Verhalten hochmarkierter Zellen ab 40 Körnchen berücksichtigt.

Beim Betrachten der in Abb. 4 gezeigten Kurve fällt ein weiteres Phänomen auf, das einer Interpretation bedarf:

Nach Erreichen des Tiefstwertes ist bei allen drei Patienten ein Wiederansteigen der Kurve in den höheren Körnchenklassen zu verzeichnen. Dies bedeutet aber, daß im beobachteten Zeitraum gegenüber den retransfundierte markierten Zellen im Blut ebenfalls vermehrt Zellen höherer Körnchenklassen auftreten. In Verbindung mit der Beobachtung, daß in den ersten Stunden nach Retransfusion die Markierungsintensität weiter ansteigt (Abb. 1 und 2), muß eine nach Retransfusion zunehmende Markierung und dadurch eine Verschiebung in höhere Körnchenklassen vermutet werden. In der oben zitierten Arbeit wird dieses Phänomen dadurch erklärt, daß in den ersten Stunden nach Inkubation ein großer Teil des inkorporierten  $^3\text{H}$ -Cytidins in löslicher Form in der Zelle vorliegt und durch Methanolfixierung extrahiert wird. Erst mit fortschreitendem Einbau in nicht extrahierbare RNS-Makromoleküle wird eine stabile Mar-

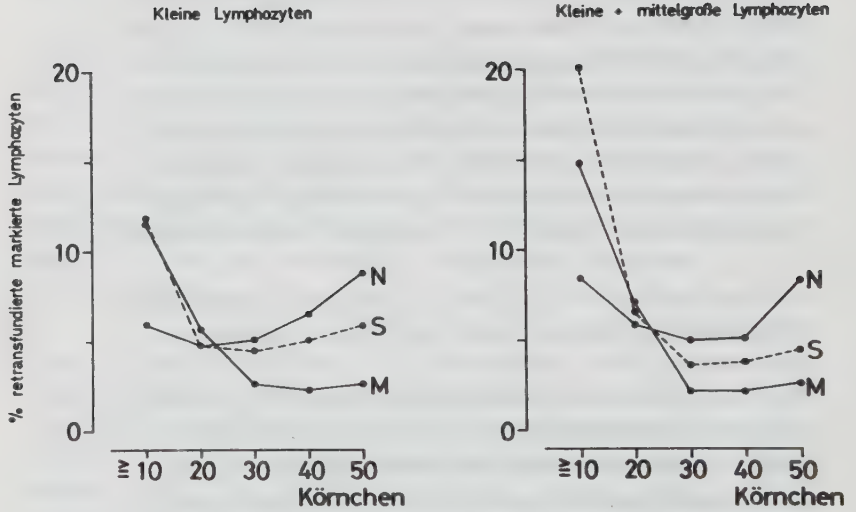


Abb. 4

Prozentsatz markierter Lymphozyten, der in der Zeit von der 20. - 70. Stunde im Blutvolumen vorhanden ist (retransfundierte Anzahl = 100 %), in Abhängigkeit von der gewählten Körnchenschwelle

kierung erreicht, so daß die Zellen später entnommener Blutproben stärker markiert sind als die Zellen unmittelbar nach Inkubation. In diesem Fall könnte man diesen Störfaktor nur dann vernachlässigen, wenn bei nahezu 100 %-iger in vitro- Markierung alle markierten Zellen betrachtet werden. Verfolgt man jedoch nur Zellen einer bestimmten Körnchenklasse, wie es bei uns der Fall ist, so werden nach Retransfusion in dieser Klasse Zellen miteingefasst, die ursprünglich der nächst tieferen Körnchenklasse angehörten und so das Ergebnis verfälschen. Aus diesem Grund wird in oben zitierter Arbeit empfohlen, zur Berechnung des rezirkulierenden Speichers nur Markierungsindices zu einem Zeitpunkt zu verwenden, an dem die Markierungsintensität wieder auf den Ausgangswert abgefallen ist. Das würde bei uns dem Zeitraum ab dem 5. Tag entsprechen (siehe Abb. 5 und 6). Eine geringgradige Überschätzung der Anzahl markierter Zellen mit mehr als 40 Körnchen im Blut ist aber auch zu diesem Zeitpunkt nicht mit Sicherheit auszuschließen.

#### WEITERE ERGEBNISSE NACH ELIMINATION DER STÖRFAKTOREN

Abb. 5 und 6 zeigen die Markierungsindexkurven der kleinen und kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten, sowie bei Patientin S den Verlauf der Markierungsintensität der Zellen, die 40 Körnchen und mehr aufwiesen. Diese Kurven stellen, aus den im vorigen Abschnitt dargelegten Gründen, "gereinigte Kurven" dar, d.h., sie sind weitgehend frei von den beschriebenen Störfaktoren.

Während sich der Anfangsteil bis zur ca. 4. Stunde kaum von den in Abb. 1 und 2 gezeigten Kurven der Lymphozyten ab 10 Körnchen unterscheidet und auch die dort gewonnenen Ergebnisse weiterhin gültig sind, bietet der anschließende Verlauf der Markierungsindices ein ganz anderes Bild. Die durch niedrig markierte neugebildete Lymphozyten hervorgerufenen periodischen Gipfel sind nicht mehr feststellbar. Statt dessen steigen die Kurven bis zu einem neuen Höchstwert zwischen der 4. und 12. Stunde flach an und fallen dann geringfügig bis zur 24. Stunde zu einem Plateau ab, das nur noch von kleinen Schwankungen unterbrochen wird.

Das Verhalten der Markierungsintensität ähnelt dem im ersten Abschnitt bei den Zellen ab 10 Körnchen beschriebenen. Durch die verminderte Anzahl von beobachteten Zellen über 40 Körnchen in späteren Zeiträumen sind allerdings starke Schwankungen festzustellen. Dies ist jedoch für die weitere Befunderhebung ohne Belang.

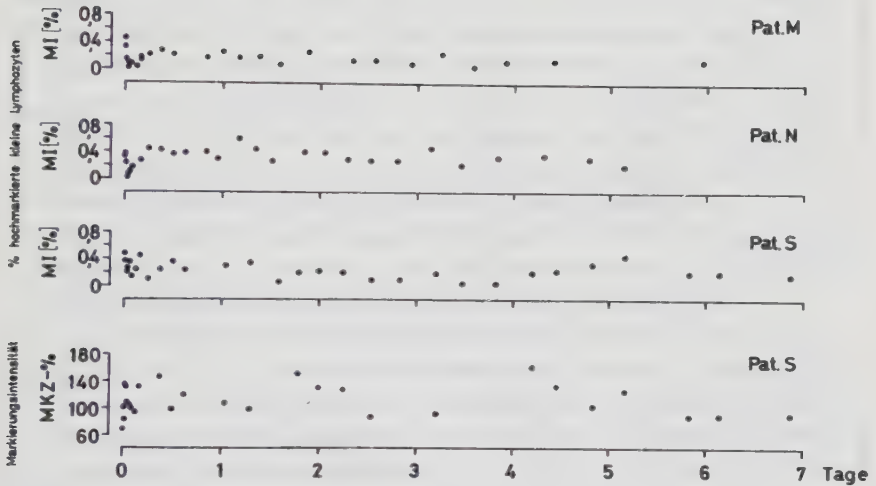


Abb. 5

oben: Zeitliche Änderung des Markierungsindex kleiner Lymphozyten mit mehr als 39 Körnchen

unten: Zeitliche Änderung der Markierungsintensität kleiner Lymphozyten mit mehr als 39 Körnchen bei der Patientin S

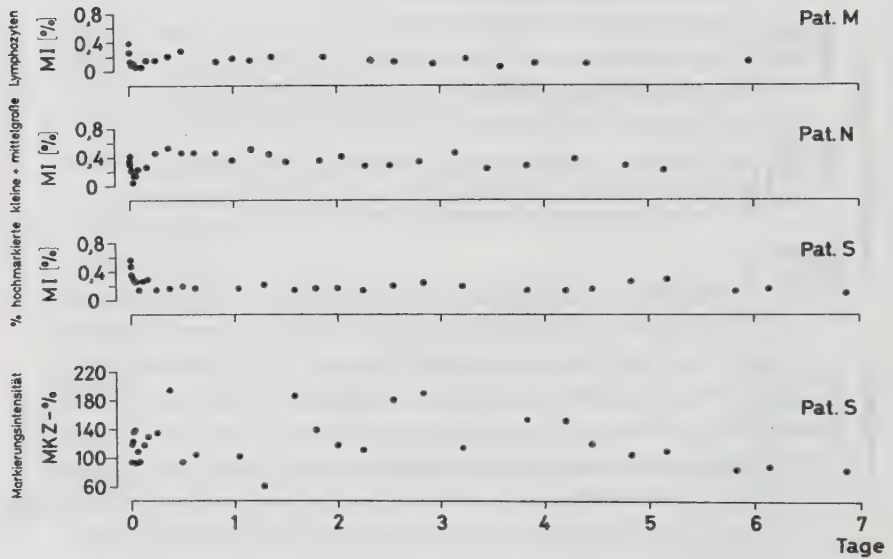


Abb. 6

oben: Zeitliche Änderung des Markierungsindex kleiner plus mittelgroße Lymphozyten mit mehr als 39 Körnchen

unten: Zeitliche Änderung der Markierungsintensität kleiner plus mittelgroßer Lymphozyten mit mehr als 39 Körnchen bei Patientin S

DISKUSSION der Ergebnisse nach Elimination von Störfaktoren

Der auch bei den "gereinigten" Kurven (Abb. 5 und 6) zwischen der 2. und 4. Stunde auftretende Wiederanstieg der Markierungsindices zeigt einen Einstrom von hochmarkierten Zellen ins Blut an. Bei diesen Zellen muß es sich aus den og. Gründen um rezirkulierende autotransfundierte Lymphozyten handeln, die das lymphatische Gewebe passiert haben. Zumindest der Zeitpunkt, wann dieser Wiederanstieg auftritt, dürfte dabei in erster Linie von über die Milz rezirkulierten Zellen bestimmt werden, da für diese die kürzesten Transitzeiten beschrieben werden. Dies würde auch das, gegenüber den anderen Patienten etwas verzögerte Auftreten des Wiederanstieges bei unserem Patienten M mit Splenomegalie und dadurch verlängerter Milztransitzeit erklären.

Der anschließend gleichbleibende Markierungsindex ist der Ausdruck für die vollständige gleichmäßige Verteilung der retransfundierte Zellen im gesamten rezirkulierenden Speicher und kann als Ausgangswert für die Berechnung der Größe dieses Speichers nach der Verdünnungsmethode benützt werden. Dabei finden aus methodischen Gründen nur die Werte ab dem 5. Tag Verwendung, da zu diesem Zeitpunkt ein großer Teil der nicht rezirkulierenden Zellen, die fast ausschließlich eine sehr kurze Lebensdauer besitzen (10, 15, 17, 22, 27, 38, 53, 56, 70), als eliminiert gelten können. Außerdem hat die Markierungsintensität nach ca. 5 Tagen wieder annähernd ihren Ausgangswert erreicht.

Bei der Berechnung des rezirkulierenden Speichers wird von folgender Überlegung ausgegangen: Würden sich die retransfundierte hochmarkierte Zellen nur im zirkulierenden Speicher, dessen Größe bekannt ist, verteilen, so wäre ein Markierungsindex zu erwarten, der in Tab. IV als M.I.<sub>III</sub> aufgeführt ist. Da sich die retransfundierte Zellen tatsächlich in einem größeren Kompartiment, nämlich dem rezirkulierenden Speicher, verteilen, ergibt sich aus der Kurve ein Markierungsindex (M.I.<sub>beob.</sub> %), der wesentlich niedriger ist. Das Verhältnis von M.I.<sub>III</sub> zu M.I.<sub>beob.</sub> gibt den Faktor an, um wieviel mal der rezirkulierende Speicher größer als der zirkulierende Speicher ist. Dies gilt natürlich nur unter der Voraussetzung, daß der beobachtete Markierungsindex im Blut die Konzentration von markierten Zellen im gesamten rezirkulierenden Speicher wiedergibt, d.h., daß ein freier Austausch zwischen dem zirkulierenden Blut und dem rezirkulierenden Speicher besteht.

Werden alle retransfundierte hochmarkierte Lymphozyten als rezirkulationsfähig angesehen, so stellt die daraus errechnete Größe des rezirkulierenden Speichers einen Maximalwert dar. Zieht man jedoch den aus dem Plateau zwischen 45 Minuten und 2 Stunden geschätzten Bestand an markierten Zellen als nicht rezirkulationsfähig ab, so kann die verbliebene Anzahl von rezirkulierenden Zellen als Ausgangswert für die Berechnung der minimalen Größe des rezirkulierenden Speichers angesehen werden. Tabelle IV zeigt diese Maximal- und Minimalwerte für die kleinen bzw. für die kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten. Dabei fällt auf, daß der Maximalwert des Verhältnis-

ses zwischen rezirkulierendem und zirkulierendem Speicher bei den kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten größer ist als bei den kleinen Lymphozyten. Dies entspricht dem höheren Anteil an nicht rezirkulierenden Zellen in dieser Population, der bei der Berechnung des Maximalwertes nicht berücksichtigt wird.

Die absolute Größe des rezirkulierenden Speichers bei den kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten erfaßt die überwiegende Mehrzahl rezirkulationsfähiger Zellen, da der geringe Prozentsatz an rezirkulierenden Zellen bei den großen Lymphozyten vernachlässigt werden kann. Sie kann deshalb als Schätzung der absoluten Größe des gesamten rezirkulierenden Speichers beim hämatologischen Normalpatienten gelten. Mit  $10^4$  bis  $250 \times 10^9$  Zellen, bzw.  $1,7$  bis  $3,9 \times 10^9$  Zellen pro kg Körpergewicht stimmt der von uns berechnete Wert gut mit den in der Literatur beschriebenen Angaben, die auf anderen Methoden basieren, überein (53, 56).

Anders verhält es sich mit der mittleren Rezirkulationszeit, die durch Umrechnung der mittleren Verweildauer der Lymphozyten im intravasalen Speicher auf den gesamten rezirkulierenden Speicher bestimmt wird. Für die mittlere Verweildauer im intravasalen Speicher wird dabei die aus der Kurve (Abb. 3) beobachtete mittlere Verweildauer im zirkulierenden Blut angenommen:

Mittl. Verweildauer im gesamten rezirk. Speicher (mittl. Rezirk.zeit) =

Mittl. Verweildauer im intravasalen Speicher (= Bluttransitzeit)

Gesamter rezirkulierender Speicher

Intravasaler Speicher

Die bei uns gefundenen Werte von 1,2 bis 2 Stunden bei Patient M, 41 Minuten bis 1,2 Stunden bei Patient N und 1,4 bis 3 Stunden bei Patientin S sind sehr niedrig im Vergleich zu den in der Literatur für Ratten angegebenen Zeiten von 5 bis 7 Stunden (22, 24). Auch mit dem bei uns in der Markierungsindexkurve sichtbaren Wiedereinstrom von markierten Zellen ins Blut stimmen unsere Zeitangaben nicht überein. Eine Erklärung dafür ist wohl vor allem in der bereits diskutierten Überschätzung des intravasalen Speichers zu suchen. Zieht man nur den zirkulierenden Speicher und einen gleichgroßen marginalen Speicher, wie er in der Literatur beschrieben wird (7, 50), zur Berechnung der mittleren Rezirkulationszeit heran, so ergeben sich auch für unsere Patienten Werte von 9 bis 15 Stunden. Die tatsächliche Rezirkulationszeit beim Menschen dürfte zwischen den genannten Werten liegen.

Zusammenfassend sei noch einmal folgendes festgestellt:

Durch Retransfusion von autologen, in vitro mit  $^3\text{H}$ -Cytidin markierten Blutlymphozyten und nachfolgender Beobachtung dieser Zellen im peripheren Blut wurde versucht, Aufschlüsse über Migrationskinetik und Größe von Lymphozytenspeichern bei Patienten ohne Erkrankungen des lymphatischen Systems zu erhalten. Dabei konnten aus dem Verhalten der markierten Lymphozyten im zirkulierenden Blut nach Retransfusion Hinweise auf Verteilungsphänomene im lymphatischen System gewonnen, sowie die Größe des rezirkulierenden Speichers

und die mittlere Verweildauer rezirkulierender Zellen im Blut bestimmt werden. Danach steht der größte Teil der zirkulierenden Blutlymphozyten in freiem Austausch mit einem rezirkulierenden Zellspeicher, der normalerweise 25 bis 35 mal so groß wie sein zirkulierender Anteil ist und insgesamt  $1,7 \text{ bis } 3,9 \times 10^9$  Lymphozyten pro kg Körpergewicht umfaßt. Rezirkulierende Zellen halten sich im Durchschnitt nur etwa 17 bis 32 Minuten im zirkulierenden Blut auf, der zirkulierende Speicher wird also täglich etwa 50 mal ausgetauscht.

Außerdem wurde ein sehr rascher, während der 8-minütigen Retransfusion stattfindender, Ausstrom von markierten Zellen aus dem zirkulierenden Blut festgestellt und in seiner Gesamtheit quantitativ erfaßt. Eine exakte Bestimmung der Größe des intravasalen Speichers ist daraus jedoch nicht ohne weiteres möglich, da neben der raschen Verteilung innerhalb dieses Speichers eine Interferenz durch andere, ebenfalls sehr rasch stattfindende, Verteilungsphänomene angenommen werden muß. Hinweise für die dominierende Rolle der Milz in dieser Phase und für die gesamte Rezirkulation, wie sie von anderen Autoren beschrieben wird, wurden auch bei uns gewonnen und diskutiert.

Tabelle IV Berechnung der Größe des  
rezyklierenden Speichers

[illegible]

Teil II:

U m s a t z k i n e t i k

von Lymphozyten bei einer Patientin mit solidem  
Tumor

## PATIENTIN UND METHODE

### Patientin:

Bei der 65-jährigen Patientin waren seit 15 Jahren eine Herzinsuffizienz, seit 10 Jahren ein Bluthochdruck bekannt. Das Auftreten einer Hemiparese links führte zur Aufnahme in die Klinik. Dieser Einweisung waren zunehmend starke Kopfschmerzen mit Sehverschlechterung vorausgegangen. Im EEG wurde ein Herdbefund und Allgemeinveränderungen, in der Hirnszintigraphie deutliche Anreicherung festgestellt. Das Serienangiogramm ließ eine verstärkte Aufnahme von Kontrastmittel mit pathologischen Gefäßbildungen erkennen. Alle diese Befunde wiesen auf das Vorliegen eines Tumors hin, der angiographische Nachweis pathologischer Gefäßbildungen ließ an ein Glioblastom denken. Bei der anschließenden Operation wurde dieser Verdacht gesichert und der Tumor, soweit möglich, entfernt. Trotz einer klinischen Besserung der Symptome im Anschluß an die Resektion ist die Prognose auf längere Sicht infaust.

Da die hämatologischen Werte der Patientin (siehe unten), mit Ausnahme einer erhöhten Blutsenkung, alle im Normalbereich lagen (3), schien sie geeignet für unseren Versuch zur Bestimmung von Neubildung, Umsatz und Lebensdauer von Lymphozyten. Nach genauer Aufklärung über Sinn, Ablauf und mögliche Risiken des Experiments gab sie ihr Einverständnis.

Hämatologische Werte:

Hb 14,3 g%, Hkt 42 %, Erythrozyten 4,67 Mill/ $\mu$ l

Hb<sub>E</sub> 30,7 pg, BKS 30/56 mm, Leukozyten 8360/ $\mu$ l

|                       |           |                      |
|-----------------------|-----------|----------------------|
| Differentialblutbild: | Stabk.    | 2 %                  |
|                       | Segmentk. | 62 %                 |
|                       | Eosinoph. | 1 %                  |
|                       | Basoph.   | 2 %                  |
|                       | Lymphoz.  | 29 % = 2440/ $\mu$ l |
|                       | Monozyt.  | 4 %                  |

Thrombozyten 154 000/ $\mu$ l

Retikulozyten 22 %.

Methode:

1. In vivo-Markierung mit <sup>3</sup>H-Thymidin

Als Isotop verwendeten wir <sup>3</sup>H-Thymidindesoxyribosid<sup>5</sup> mit der spezifischen Aktivität von 5 Ci/mMol, das während der DNS-Synthesephase in die Zelle eingebaut wird. Es wurde drei Tage lang kontinuierlich in insgesamt 3000 ml Glucose/Ringerlösung über einen Venenkatheter angeboten. Mit Hilfe einer Dosierpumpe konnte eine Tagesdosis von 0,1  $\mu$ Ci/g Körpergewicht eingestellt werden.

Blutproben wurden am ersten Tag alle zwei Stunden, vom zweiten bis vierten Tag im Abstand von 5 Stunden, bis zum 15. Tag alle 12 Stunden und vom 16. bis 42. Tag einmal

<sup>5</sup>Radiochemical Centre Amersham, Great Britain

täglich abgenommen. Die Zahl der Leukozyten wurde mit einem Coulter Counter bestimmt und Zellkonzentrationsstriche angefertigt. Diese wurden 3 x 10 Minuten in Methylalkohol fixiert und dann autoradiographiert.

Nach 350 Tagen Expositionszeit wurden die Präparate entwickelt und nach Giemsa bei pH 5,75 gefärbt.

## 2. In vitro-Markierung mit $^3\text{H}$ -Thymidin

Zur Erfassung DNS-synthetisierender Lymphozyten im peripheren Blut wurden vor Beginn der Dauerinfusion Blutproben entnommen, mit  $^3\text{H}$ -Thymidin (2  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  Blut) für 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert und Zellkonzentrationsstriche angefertigt, die wie oben beschrieben weiterbehandelt und autoradiographiert wurden.

## 3. Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der Präparate, d.h., Ausschaltung der unspezifischen Hintergrundmarkierung, Größenbestimmung und Bestimmung des Markierungsindex erfolgte in gleicher Weise wie bereits in Teil I, Abschnitt Patienten und Methode, beschrieben. Bei der Berechnung der mittleren Körnchenzahl und der Beurteilung, ob eine Zelle durch  $^3\text{H}$ -Thymidin markiert ist, wurde hier nur die Kernmarkierung berücksichtigt.

## ERGEBNISSE

Um Aufschlüsse über Neubildung, Umsatz und Lebensdauer von Blutlymphozyten zu erhalten, wird auch bei dieser Methode das Auftreten und Verschwinden markierter Zellen im peripheren Blut an Hand der zeitlichen Änderung von Markierungsindex und mittlerer Markierungsintensität verfolgt.

In den folgenden Abbildungen wird diese Änderung von Markierungsindex und Markierungsintensität während der 3-tägigen Dauerinfusion und für einen längeren Zeitraum danach sowohl für die gesamte Population der Blutlymphozyten (Abb. 7), als auch gesondert für Einzelfraktionen (Abb. 8) dargestellt. Dabei werden, im Gegensatz zum ersten Teil, auch die großen Lymphozyten betrachtet, da sie auf Grund ihres hohen Anteils an kurzlebigen Zellen wesentlich am Gesamtumsatz der Blutlymphozyten beteiligt sind. Auf eine gesonderte Darstellung der kleinen Lymphozyten wird dagegen verzichtet, da sie wiederum, auf Grund ihres hohen Anteils an langlebigen Zellen, nur wenig zum Gesamtumsatz beitragen. Sie sind aber in der Gruppe der kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten mit erfaßt. Die Möglichkeit eines direkten Vergleiches mit den in Teil I erhobenen migrationskinetischen Befunden ist für diese Gruppe von kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten gewährleistet.

### 1. In vitro-Markierung von Blutproben mit $^3\text{H}$ -Thymidin

Zum überwiegenden Teil handelt es sich bei Blutlymphozyten um nicht proliferierende Ruhezellen.

Ein geringer Prozentsatz besitzt jedoch die Fähigkeit zur DNS-Synthese. Diese Zellen werden in dem vorliegenden Versuch mit dem DNS-Marker  $^3\text{H}$ -Thymidin ebenfalls in vivo markiert. Um eine Abgrenzung gegenüber den neugebildeten Zellen zu ermöglichen, wurde ihr Anteil vor Versuchsbeginn mittels in vitro-Inkubation von Blutproben mit  $^3\text{H}$ -Thymidin gesondert bestimmt. Dabei ergab sich, daß bei unserer Patientin 0,082 % der Blutlymphozyten in vitro markierbar sind. Diese DNS-synthetisierenden Zellen gehörten ausschließlich zur Gruppe der mittelgroßen und großen Lymphozyten.

## 2. Verlauf der Markierungsindices der in vivo markierten Blutlymphozyten

Die ersten neugebildeten markierten Zellen treten ca. 3 Stunden nach Versuchsbeginn im Blut auf. Zu diesem Zeitpunkt lag der Markierungsindex mit 0,16 % über dem Bestand an DNS-synthetisierenden Blutlymphozyten, der vorher mit 0,08 % aller Zellen berechnet wurde. In den nächsten Stunden nimmt die Anzahl markierter Zellen im Blut rasch zu. Die Markierungsindexkurve (Abb. 7) steigt dementsprechend nach 24 Stunden auf einen Wert von 0,8 %, nach Ende der 3-tägigen Dauerinfusion auf einen Wert von 2,2 % an und erreicht nach einem etwas flacheren Teilstück zwischen dem 4. und dem 5. Tag ihren höchsten Punkt mit 2,5 %. Der sich anschließende annähernd exponentielle Abfall geht nach ca. 3 1/2 Wochen in ein "Plateau" von 0,4 % über. Wird dieser Teil der Kurve auf semilogarithmisches Papier ausgetragen, so ergibt sich für die abfallende Komponente eine Halbwertszeit von 9,4 Tagen (Abb. 9).

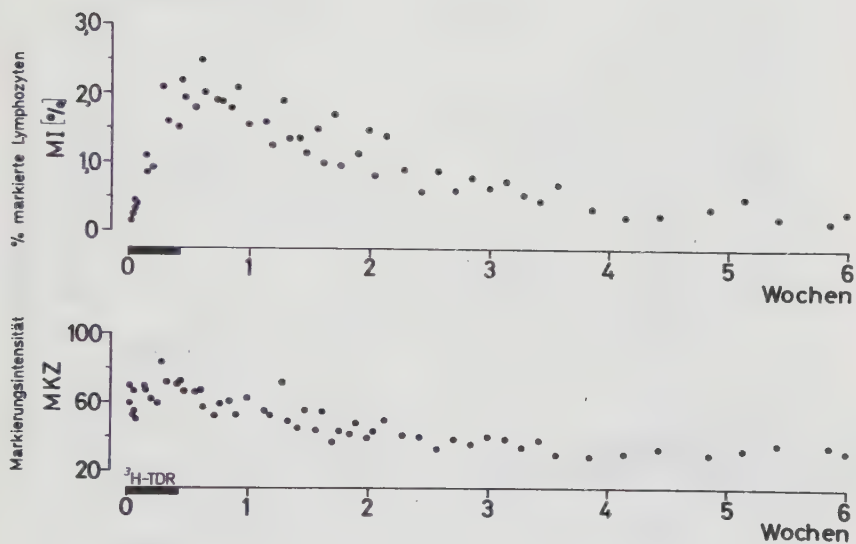


Abb. 7

Zeitliche Änderung des Markierungsindex und der Markierungsintensität für die Gesamtlymphozyten

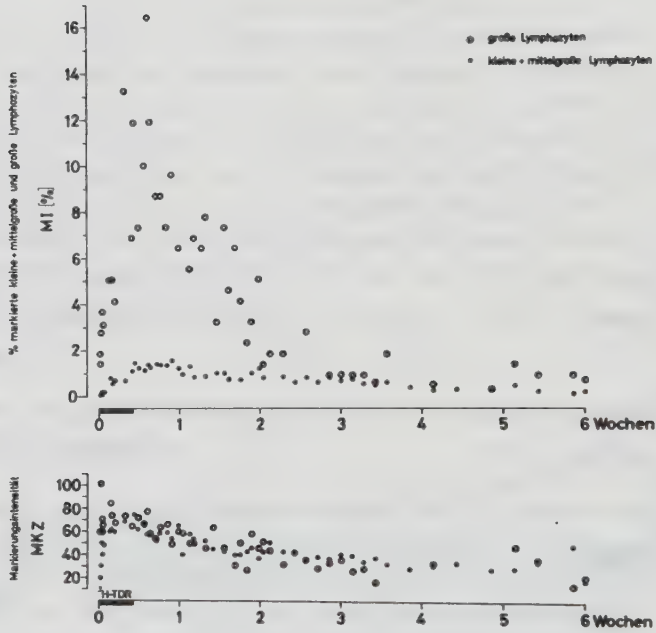


Abb. 8

Zeitliche Änderung des Markierungsindex und der Markierungsintensität  
für die großen und kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten

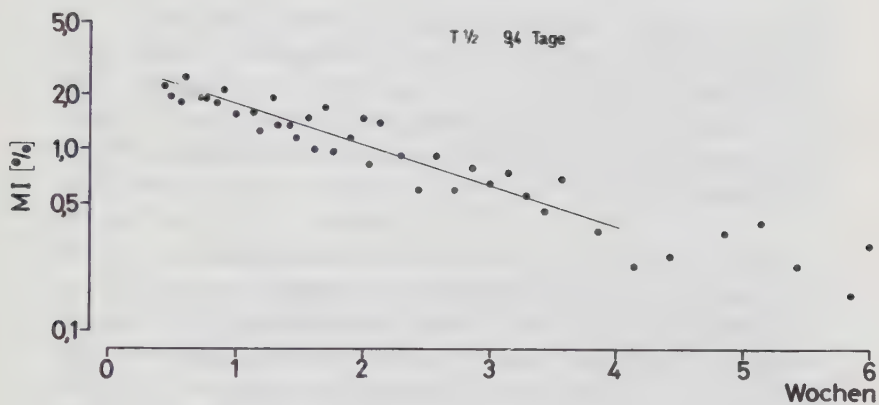


Abb. 9

Halbwertszeit des Verschwindens kurzlebiger markierter Lymphozyten aus dem Blut ( Gesamtindex - semilogarithmische Darstellung )

Betrachtet man die entsprechenden Kurven, die sich durch gesonderte Auswertung der großen bzw. kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten ergeben (Abb. 8), so sind trotz des insgesamt ähnlichen Verlaufs der Markierungsindices entscheidende Unterschiede zwischen den einzelnen Populationen feststellbar.

Bereits nach 24 Stunden erscheinen 6 % aller großen Lymphozyten als markiert, nach ca. 4 Tagen wird ein Gipfelwert von 16 % erreicht, von diesen 16 % sind nach einem relativ raschen Abfall nur noch 0,5 % markierte Zellen gegen Ende des Versuches im Blut vorhanden.

Dagegen verläuft der Anstieg der kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten wesentlich flacher bis zu einem Wert von 1,4 % am 5. Tag, das nach ca. 4 Wochen auftretende Plateau ist mit 0,4 % relativ hoch. Die entsprechenden Halbwertszeiten des exponentiellen Abfalls betragen 4,8 Tage für die großen und 10,5 Tage für die kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten.

### 3. Verlauf der Markierungsintensitäten der in vivo markierten Blutlymphozyten (Abb. 7 und 8)

Wie aus Abb. 7 zu entnehmen ist, weisen die ersten markierten Zellen eine durchschnittliche Körnchenzahl von ca. 60 pro Zelle auf. Erst nach einem leichten Abfall steigt die Kurve bis zum Ende der Dauerinfusion am 3. Tag auf ihren höchsten Wert von 73 Körnchen pro Zelle an. Von diesem Zeitpunkt an ist

ein stetiges langsames Absinken der Markierungsintensität zu beobachten. Der tiefste Wert von 35 Körnchen wird etwa nach 2 Wochen erreicht und bleibt bis Versuchsende annähernd konstant.

Wenn man zum Vergleich den Verlauf der Markierungsintensität bei den kleinen plus mittelgroßen bzw. bei den großen Lymphozyten einzeln betrachtet (Abb. 8), so stellt man fest, daß die anfänglich hohen Werte sowie das zwischenzeitliche Absinken der Gesamtkurve in den ersten Stunden im wesentlichen vom Verhalten der großen Lymphozyten bestimmt war. Hier ist in der Anfangsphase der gleiche Kurvenverlauf zu sehen, während die kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten ein ganz anderes Bild zeigen. Die Markierungsintensität steigt bei diesen Zellen, ausgehend von einem niedrigen Wert von 20 Körnchen pro Zelle, zunächst steil, dann etwas flacher, bis zu ihrem höchsten Wert von 75 am Ende der Dauerinfusion an. Der für die Gesamtpopulation oben beschriebene Abfall verläuft dagegen bei allen 3 Kurven ähnlich und erreicht jeweils ca. die Hälfte des Wertes, der gegen Ende der Dauerinfusion zu beobachten ist. Die Störung in der Anfangsphase bei den großen Lymphozyten muß auf eine Interferenz mit DNS-synth. Blutzellen zurückgeführt werden. Diese schon sehr früh markierten Zellen gehören vorwiegend der Klasse der großen Lymphozyten an und besitzen eine sehr hohe Körnchenzahl, so daß sie die mittlere Markierungsintensität der ersten neugebildeten Zellen verfälschen.

## DISKUSSION

Setzt man voraus, daß es sich bei den im Laufe des Versuches auftretenden markierten Lymphozyten mit Ausnahme der bereits angesprochenen DNS-synthetisierenden Blutlymphozyten um neugebildete Zellen handelt, die durch Teilung aus in ihrer DNS-Synthesephase mit  $^3\text{H}$ -Thymidin markierten Vorläuferzellen entstanden sind, so lassen sich aus Zeitpunkt und Geschwindigkeit ihres Auftretens im Blut sowie Art und Geschwindigkeit ihrer Elimination aus diesem Kompartiment wichtige Aufschlüsse über Neubildung, Umsatz und Lebensdauer dieser Blutzellen ableiten.

Ausgehend von der Interpretation der einzelnen Kurvenabschnitte kamen wir dabei zu folgenden Überlegungen:

Da  $^3\text{H}$ -Thymidin als spezifischer DNS-Marker nur von proliferierenden Zellen in der S-Phase eingebaut wird, muß jede markierte Zelle im Blut durch Teilung aus einer dieser proliferierenden Zellen hervorgegangen sein. Der Zeitraum vom Beginn der Dauerinfusion bis zum Auftreten der ersten markierten neugebildeten Zellen im Blut entspricht also der Minimalzeit, die vom Ende der S-Phase ihrer Vorläuferzellen bis zum Ausschwemmen der neugebildeten Zellen ins Blut benötigt wird. Sie umfaßt damit die prämitotische Ruhephase ( $G_2$ ), die Mitosephase (M) sowie die Ausschwemmungszeit aus dem proliferierenden Kompartiment

ins periphere Blut. Tatsächlich müssen für die  $G_2$ -Phase ca. 2 Stunden und für die M-Phase ca. 30 Minuten angenommen werden, wie durch andere Methoden festgestellt wurde (34, 62, 71). Dies entspricht ziemlich genau der von uns beobachteten Zeitdauer von 3 Stunden.

Im Vergleich zu den für andere Blutzellen, wie Granulozyten und Monozyten, bestimmten Zeiträumen (14, 18, 31), ist der von uns ermittelte Wert sehr kurz. Daraus muß geschlossen werden, daß zumindest ein Teil der Lymphozyten im Gegensatz zu den vorher genannten Zellen keine oder nur eine verschwindend geringe Ausreifungszeit benötigt, bevor sie in das Blut abgegeben werden.

Bestätigt werden die oben gemachten Annahmen auch durch den Verlauf der Markierungsintensitäten. So ist aus der Kurve für die kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten, die zu diesem Zeitpunkt als einzige verwertbar ist, zu ersehen, daß die ersten auftretenden Zellen sehr niedrig markiert sind, entsprechend der Annahme, daß sich ihre Vorläuferzellen zu Beginn der Dauerinfusion von  $^3\text{H}$ -Thymidin bereits am Ende der S-Phase befanden. Auch die weitere starke Zunahme der Markierungsintensität in den nächsten 12 Stunden, also der durchschnittlichen Dauer der DNS-Synthesephase, ist in diesem Sinne zu interpretieren.

Der bis einige Stunden nach Ende der Dauerinfusion anhaltende Anstieg der Markierungsintensität wird zunehmend flacher und ist Ausdruck der steigenden Anzahl von Vorläuferzellen, die pro neugebildeter

Zelle in ihrer DNS-Synthesephase markiert worden sind. Der sich anschließende Abfall der Markierungsintensität wiederum kennzeichnet den Einstrom niedrig markierter Zellen, die durch Entleerung des durchmarkierten Vorläuferkompartments entstanden sind. Da dieser Abfall der Markierungsintensität jedoch zeitlich bis über den Gipfelpunkt der Markierungsindexkurve hinausreicht, ist mit einer Störung der Abfallphase dieser Kurve durch das noch einige Zeit andauernde Nachströmen relativ niedrig markierter Zellen ins Blut zu rechnen. Die für die Abfallphase angegebenen Halbwertszeiten dürften deshalb etwas überschätzt sein, wenn auch berücksichtigt werden muß, daß der Abstrom der im Durchschnitt höher markierten kurzlebigen Lymphozyten (54, 68) am Absinken der Markierungsintensität mit beteiligt ist.

Betrachtet man als nächstes den Verlauf der Markierungsindexkurve der Gesamtlymphozyten (Abb. 7) so ist aus dem starken Ansteigen der Markierungsindices innerhalb der ersten Tage zu ersehen, daß in diesem Zeitraum eine ständige Zunahme markierter Zellen im Blut stattfindet. Aus der Steilheit des Anstieges läßt sich eine Anstiegsrate von 0,9 % pro Tag, entsprechend einer Einstromrate von 22 Zellen/ul Blut/Tag bestimmen. Diese Anstiegsrate muß aus dem Anfangsteil der Kurve entnommen werden, da zu diesem Zeitpunkt der exponentielle Abstrom markierter Zellen noch sehr gering ist. Nimmt man an, daß in diesem Zeitraum alle neugebildeten Zellen aus markierten Vorläuferzellen hervorgehen,

d.h., also nur markierte Lymphozyten ins Blut einströmen, so entspricht die berechnete Einstromrate von 22 Zellen/ $\mu$ l Blut/Tag der Neubildungsrate von Blutlymphozyten, die Anstiegsrate von 0,9 % der durchschnittlichen Umsatzrate. Das bedeutet aber, daß bei gleichbleibender Lymphozytenzahl pro Tag 0,9 % der Blutlymphozyten durch neugebildete Zellen ersetzt werden. Durch Extrapolation dieses Wertes auf 100 % würde sich eine Zeitdauer von 110 Tagen ergeben, bis sich die Gesamtpopulation umgesetzt hat. Die durchschnittliche Lebensdauer der Blutlymphozyten beträgt also 110 Tage. Tatsächlich bietet die durchschnittliche Umsatzzeit von 110 Tagen aber keinen Hinweis auf die Lebensdauer der Lymphozyten, da die Gesamtpopulation, wie aus dem Abfall zu ersehen ist, aus mindestens zwei, in bezug auf die Geschwindigkeit ihrer Elimination unterschiedlichen Subpopulationen - einer kurzlebigen und einer langlebigen - besteht. Darüberhinaus zeigt die Form der Abfallkurve der kurzlebigen Lymphozyten, daß selbst die Zellen innerhalb der einzelnen Populationen keine definierte Lebensdauer besitzen, sondern exponentiell, also nach den Zufallsgesetzen ungeachtet ihres Lebensalters, aus dem Blut verschwinden. Für sie kann lediglich die mittlere Lebensdauer aus der Halbwertszeit ihrer Elimination berechnet werden ( $T_{1/2}/\ln 2$ ). Sie beträgt in unserem Versuch für die kurzlebigen Zellen 13,5 Tage entsprechend der ermittelten Halbwertszeit von 9,4 Tagen.

Während Art und Geschwindigkeit der Elimination für die kurzlebigen Lymphozyten ohne weiteres aus der raschen Abfallskomponente unserer Kurve ersichtlich wird, gilt das nicht für die langlebigen Zellen,

die wegen der relativen Kürze des Versuchszeitraumes keinen wesentlichen Abfall bemerken lassen. Lediglich der Bestand an markierten langlebigen Zellen kann aus der Höhe des von uns als "Plateau" beschriebenen Teils der Markierungsindexkurve entnommen werden. Er beträgt ca. 0,4 % bzw. 10 markierte Zellen / $\mu$ l Blut. Nimmt man an, daß sich diese langlebigen Zellen über einen Zeitraum von 5 Tagen im Blut angesammelt haben, wie aus der Markierungsindexkurve zu entnehmen ist, so errechnet sich für sie eine Anstiegsrate von 0,08 %/Tag bzw. eine Neubildungsrate von 2 Zellen/ $\mu$ l Blut/Tag.

Aus dieser Neubildungsrate und dem Gesamtbestand langlebiger Zellen im Blut kann aber wiederum auf deren mittlere Umsatzzeit geschlossen werden, wie dies bereits für die Gesamtpopulation geschehen ist. Sie beträgt bei unserem Versuch 1100 Tage, wobei als Gesamtbestand langlebiger Zellen im Blut 89 % aller Blutlymphozyten angenommen wurde. Diese Annahme stützt sich auf die Schätzung des Anteiles kurzlebiger Zellen von 11 % der Gesamtlymphozytenzahl, die nach der Formel

$$K = A_K \times T_K$$

erfolgte. Dabei bedeutet K den prozentualen Anteil,  $A_K$  die für die kurzlebigen Lymphozyten verbleibende Anstiegsrate von 0,82 %/die und  $T_K$  die schon angesprochene mittlere Lebensdauer dieser Zellen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei dieser Patientin 22 Zellen/ $\mu$ l Blut/Tag neugebildet werden, wovon der größte Teil, nämlich 20 einer kurzlebigen Population mit einer mittleren Lebensdauer von 13,5 Ta-

gen angehört. Die Neuproduktion von langlebigen Zellen beträgt dagegen mit 2 Zellen/ul Blut/Tag ein Zehntel der Gesamtproduktion, genügt aber, um den Bestand an langlebigen Zellen von fast 90 % aller Blutlymphozyten zu erhalten. Für sie berechnet sich eine mittlere Lebensdauer von 3 Jahren.

Wertet man nach der gleichen Methode die Markierungsindexkurven der großen bzw. kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten aus (siehe Tabelle V), so fällt als erstes der hohe Anteil der großen Lymphozyten am Gesamtumsatz auf. 11 neugebildete Zellen/ul/Tag, also die Hälfte aller neugebildeten Zellen, sind große Lymphozyten, obwohl der Anteil großer Lymphozyten am Gesamtbestand nur etwa 7 % beträgt. Die durchschnittliche Umsatzzeit ist dementsprechend kurz, sie beträgt 16,7 Tage. Dies ist auf den hohen Anteil kurzlebiger Zellen in dieser Fraktion zurückzuführen, der 41 % gegenüber 11 % bei der Gesamtpopulation beträgt. Fast alle neugebildeten großen Lymphozyten (ca. 98 %) sind kurzlebige Zellen, die sich mit einer mittleren Lebensdauer im Blut von 6,9 Tagen umsetzen.

Wesentlich andere Verhältnisse herrschen bei der Gruppe der kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten. Sie setzen sich mit einer langen durchschnittlichen Umsatzzeit von 207 Tagen um, entsprechend ihrem vergleichsweise geringen Anteil von 50 % an der Neuproduktion, was auf eine lange durchschnittliche Lebensdauer dieser Zellen schließen läßt. Doch zeigt auch hier schon der Vergleich ihrer durchschnittlichen Umsatzzeit mit der vorher ermittelten Lebensdauer von langlebigen Zellen von 1100

Tagen, daß die kleinen plus mittelgroßen Lymphozyten keine homogene Population von langlebigen Zellen darstellen, sondern ebenfalls kurzlebige Zellen enthalten. Dieser Anteil an kurzlebigen kleinen plus mittelgroßen Zellen ist mit 6 % ziemlich niedrig, doch werden zur Erhaltung dieses Bestandes immerhin 9 Zellen/ $\mu$ l Blut/Tag gebildet. Dies entspricht ca. 80 % der gesamten Neuproduktion von kleinen plus mittelgroßen Zellen im Blut.

Eine Diskussion dieser Ergebnisse an Hand von Befunden in der Literatur ist schwierig, da unseres Wissens bisher fast keine vergleichbaren Untersuchungen am hämatologischen Normalpatienten durchgeführt wurden. Veröffentlichungen über die mittlere Lebensdauer langlebiger Lymphozyten durch Verfolgen von Chromosomenaberrationen nach Strahlentherapie (9, 46) zeigen aber, daß die von uns gefundene Lebensdauer von 1100 Tagen ziemlich genau zwischen den dort angegebenen Werten liegt. Dabei wird der von NORMAN et. al. (46) ermittelte Wert von 530 Tagen vom Autor selbst aus methodischen Gründen als Minimalwert bezeichnet. Auch bei der mittleren Lebensdauer von 1574 Tagen, die von BUCKTON et. al. (9) beschrieben wird, wird vom Untersucher selbst nicht ausgeschlossen, daß es sich um eine Überschätzung handelt.

Einen gewissen Hinweis darauf, daß sich die Hauptmasse der Lymphozyten nur langsam umsetzt, bietet das Verhalten der peripheren Lymphozytenzahlen bei hämatologischen Normalpersonen, die wegen solider Tumoren oder aus anderen Gründen einer Strahlentherapie unterzogen wurden

(9, 65). So werden z. B. von BUCKTON et. al. in der oben zitierten Arbeit sehr lange Zeiten beschrieben, bis sich die peripheren Lymphozytenzahlen bei Patienten mit Morbus Bechterew nach Bestrahlung wieder normalisierten. Dabei kann eine Beeinträchtigung der Proliferation zumindest im Strahlenfeld bei diesen Patienten nicht ausgeschlossen werden. Die Art, wie die Lymphozytenzahlen nach Strahlentherapie ansteigen, spricht jedoch für eine relativ konstante Neubildungsrate, die Tatsache, daß wieder Normalwerte erreicht werden, macht eine erhebliche Reduzierung dieser Neubildungsrate unwahrscheinlich.

Ein täglicher Einstrom von 2 langlebigen Lymphozyten mit einer mittleren Lebensdauer von 1100 Tagen, wie er von uns gefunden wurde, würde der beschriebenen Zunahme der peripheren Lymphozytenzahlen gut entsprechen.

Tabelle V U m s a t z k i n e t i s c h e   D a t e n

|                                           | Lymphozyten/ $\mu$ l<br>Blut | Anstiegsrate<br>Gesamt $\swarrow$ $\searrow$<br>langlebig   kurzlebig<br>% | Umsatzzeit<br>Gesamt $\swarrow$ $\searrow$<br>langlebig   kurzlebig<br>dies | Einstromrate mark.<br>Lymphozyten ins<br>Blut/ $\mu$ l/die | Prozentualer Anteil<br>kurzlebiger Lymph.<br>im Blut<br>% |
|-------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Gesamtpopulation                          | 2440 = 100 %                 | 0,9 $\swarrow$ $\searrow$ 0,08<br>0,82                                     | 110 $\swarrow$ $\searrow$ 1100<br>13,5<br>(Tl/2 9,4)                        | 22 $\swarrow$ $\searrow$ 2<br>20 (9%)<br>20 (91%)          | 11                                                        |
| Kleine plus<br>mittelgroße<br>Lymphozyten | 2260 = 92,7 %                | 0,48 $\swarrow$ $\searrow$ 0,08<br>0,40                                    | 207 $\swarrow$ $\searrow$ 1174<br>15,2<br>(Tl/2 10,5)                       | 11 $\swarrow$ $\searrow$ 1,8<br>9,2 (18%)<br>9,2 (82%)     | 6                                                         |
| Große<br>Lymphozyten                      | 180 = 7,3 %                  | 6,0 $\swarrow$ $\searrow$ 0,1<br>5,9                                       | 16,7 $\swarrow$ $\searrow$ 590<br>6,92<br>(Tl/2 4,8)                        | 11 $\swarrow$ $\searrow$ 0,2<br>10,8 (2%)<br>10,8 (98%)    | 41                                                        |

Teil III:

Gesamtdarstellung der Lympho-  
zytenkinetik beim hämatologi-  
schen Normalpatienten

Faßt man die von uns bisher diskutierten Ergebnisse kurz zusammen und stellt sie in den Rahmen der in der Literatur beschriebenen Befunde, so kommt man zu folgendem zellkinetischen Gesamtkonzept:

Die zirkulierenden Blutlymphozyten sind Teil eines größeren Lymphozytenspeichers, der intravasal oder in naher Beziehung zum Blutgefäßsystem vermutet werden muß, da sich die Zellen innerhalb dieses Speichers in einer mit unserer Methode nicht erfaßbaren Geschwindigkeit verteilen. Als Lokalisation für die nicht zirkulierenden Zellen dieses Speichers müssen Bereiche mit niedriger Strömungsgeschwindigkeit, also Gefäßwände und vor allem Gefäßerweiterungen angenommen werden, dabei dürften Organen wie Milz, Leber und Lunge eine besondere Rolle zukommen. Die Verteilung zwischen zirkulierendem und nicht zirkulierendem Anteil scheint deshalb nicht zuletzt von der hämodynamischen Gesamtsituation abhängig zu sein.

Bei unserem Patient M mit massiver Stauung im Splanchnicusgebiet und stauungsbedingter Splenomegalie konnte nur weniger weniger als 1/10 des intravasalen Speichers in Zirkulation gefunden werden. Bei Vorliegen normaler Strömungsverhältnisse ist unter Bettruhe der intravasale Speicher ca. fünf mal größer als der zirkulierende Speicher (Patientin S).

Wie aus dem Verhalten markierter retransfundierter Zellen weiterhin zu ersehen ist, findet neben der initialen intravasalen Verteilung ein ständiger rascher Ausstrom von Blutlymphozyten ins Gewebe statt. Dieser Ausstrom, an dem fast ausschließlich langlebige, also etwa 80 bis

90 % aller Blutlymphozyten teilnehmen, erfolgt mit einer Halbwertszeit von 12 bis 21 Minuten, das entspricht einer mittleren Verweildauer im Blut von etwa 17 bis 30 Minuten. Bei konstant bleibender Blutzellzahl bedeutet dies aber, daß der größte Teil des zirkulierenden Speichers täglich etwa 50 mal ausgetauscht wird. Dieser massive Zellstrom beruht auf der Fähigkeit der Lymphozyten zur **Re z i r k u l a t i o n**, d.h., nach dem Austritt ins lymphatische und nicht lymphatische Gewebe ins Blut zurückzukehren. Das Phänomen der Rezirkulation, das bisher nur bei den Lymphozyten bewiesen wurde, ist seit längerem bekannt und wurde von zahlreichen Autoren näher untersucht (26, 27, 36, 43, 63). Es wurden bisher folgende Rezirkulationswege beschrieben:

1. Rezirkulation durch die Lymphknoten

Die Lymphozyten gelangen durch postkapilläre Venolen in das lockere Gewebe des Paracortex und über Gewebespalten in die Lymphsinus, weiter in die efferenten Lymphgänge und über den Ductus thoracicus wieder ins Blut.

2. Rezirkulation durch die Gewebe

Die Lymphozyten verlassen das Blut durch Kapillaren und Venolen der Gewebe, kommen mit der afferenten Lymphe zu den Lymphknoten und über deren Sinus in die efferente Lymphe, von hier aus gelangen sie über den Ductus thoracicus oder andere Hauptlymphgänge ins Blut.

3. Rezirkulation durch die Milz

Die Lymphozyten wandern von der weißen Milzpulpa über periarterioläre lymphatische Begleitscheiden in präformierte Gewebsskanäle und gelangen so ins Milzvenenblut.

Die Minimalzeiten, die die rezirkulierenden Zellen für diese Wege benötigen, werden in der Literatur mit ein bis fünf Stunden für die Rezirkulation über die Lymphknoten (8, 53) und mit ca. einer Stunde für die Milzpassage (49) angegeben. Die durchschnittliche Rezirkulationszeit, bestimmt aus der Abstromgeschwindigkeit aus dem Blut, beträgt bei uns zwischen 9 und 15 Stunden. Dabei kann die durchschnittliche Rezirkulationszeit über die Milz ebenfalls kürzer als über die Lymphknoten angenommen werden (2). Dies weist schon darauf hin, welchem der drei Wege die größte Bedeutung zukommt. In bezug auf die Stärke des Rezirkulationsstromes muß die Milz nach heutiger Auffassung als Hauptrezirkulationsorgan angesehen werden. Dies wurde durch folgende Untersuchungen nachgewiesen:

Leitet man die Ductus-thoracicus-Lymphe, in der sich der größte Teil der über Gewebe und Lymphknoten rezirkulierenden Zellen befindet, ab, so kann festgestellt werden, daß auf diesem Wege nur etwa das 1-2-fache der zirkulierenden Blutlymphozytenzahl täglich ins Blut zurückkehrt (25, 53, 55, 56, 69, 75). Diese Menge reicht bei weitem nicht aus, den beschriebenen massiven Ausstrom, der etwa 50 mal den zirkulierenden Speicher umfaßt, auszugleichen. Die Hauptmasse der rezirkulierenden Zellen muß also den Weg über die Milz genommen haben.

Ein weiterer deutlicher Hinweis auf die dominierende Rolle der Milz ergibt sich aus der sehr stark verlängerten Blutverweildauer, die von PABST und TREPEL (50) nach Splenektomie beim Schwein gefunden wurde. Eine Beurteilung der einzelnen Rezirkulationsströme war mit unserer Methode nicht möglich, jedoch konnte bei unserem

Patienten M mit Splenomegalie eine auffallend kurze Blutverweildauer festgestellt werden. Außerdem war die Zeitdauer bis zum Wiedererscheinen der ersten rezirkulierten Zellen, die im wesentlichen durch die Milzpassage bestimmt wird, gegenüber den anderen Patienten verlängert.

Die absolute Größe des gesamten rezirkulierenden Lymphozytenspeichers war bei allen unseren Patienten trotz der Unterschiede in Verteilung und Rezirkulation fast identisch. Nach unseren Berechnungen umfaßt der rezirkulierende Speicher bei Patienten ohne hämatologische Systemerkrankungen  $2-3,5 \times 10^9$  Lymphozyten pro kg Körpergewicht. Dieser Wert stimmt mit den Ergebnissen überein, die durch Langzeitdrainagen des Ductus thoracicus ermittelt wurden (53, 56). Der rezirkulierende Speicher ist damit im Normalfall etwa 25 mal so groß wie der zirkulierende Speicher.

Wie unsere Befunde zeigen, ist diese Angabe jedoch zur quantitativen Charakterisierung des rezirkulierenden Speichers nur bedingt geeignet, da die Anzahl zirkulierender Blutlymphozyten eine variable Größe darstellt und von der Verteilung innerhalb des intravasalen Speichers abhängig ist. Im Gegensatz dazu ist der rezirkulierende Speicher eine absolute Größe, die ausschließlich von Neubildung, Elimination und Lebensdauer rezirkulationsfähiger Zellen bestimmt wird. Diese **u m s a t z k i n e t i s c h e n** Parameter sollen im folgenden für die Blutlymphozyten insgesamt dargestellt werden.

Für die zirkulierenden Blutlymphozyten wurde von uns eine tägliche Umsatzrate von 0,9 % ermittelt. Dies entspricht einem Einstrom von 22 Zellen/ $\mu$ l Blut/Tag; davon

können 20 als kurzlebig mit einer mittleren Lebensdauer von 13,5 Tagen, 2 als langlebig mit einer mittleren Lebensdauer von 1100 Tagen angesehen werden.

Da der rezirkulierende Speicher fast ausschließlich aus langlebigen Zellen besteht (10, 15, 17, 22, 27, 38, 53, 56, 70), kann für dieses Kompartiment die gleiche Umsatzrate wie für die langlebige Population der Blutlymphozyten angenommen werden. Umgerechnet auf den Gesamtbestand an rezirkulierenden Lymphozyten von  $2 - 3,5 \times 10^9$  Zellen pro kg Körpergewicht ergibt sich also eine tägliche Neuproduktion von  $1,8 - 3,2 \times 10^6$  rezirkulierenden Zellen pro kg Körpergewicht.

Im Gegensatz dazu kann im intravasalen Speicher die gleiche Zusammensetzung aus kurz- und langlebigen Zellen angenommen werden, wie sie im zirkulierenden Blut gefunden wird. Außer den bereits zum größten Teil im rezirkulierenden Speicher erfaßten langlebigen Zellen strömen also täglich noch  $4,8 - 5,5 \times 10^6$  kurzlebige Zellen pro kg Körpergewicht in den intravasalen Speicher ein. Diese kurzlebigen Zellen haben natürlich ebenfalls die Möglichkeit, aus dem Blut ins lymphatische und nicht-lymphatische Gewebe abzufließen. Im Gegensatz zu den rezirkulierenden Zellen nimmt man jedoch an, daß sie nicht mehr ins Blut zurückkehren, sondern meist in Erfüllung ihrer immunologischen Aufgabe verbraucht werden. Dies drückt sich in der kurzen Lebensdauer dieser Zellen aus. Funktionell wird in dieser Gruppe die Masse der immunologischen Effektorzellen vermutet, zum Teil sollen auch primär immunkompetente Zellen enthalten sein (47, 66). Die Gruppe der langlebigen Lymphozyten soll dagegen vor allem aus immunologischen Gedächtniszellen sowie primär

immunkompetenten Zellen bestehen (5, 29, 30, 42, 66).

Primär immunkompetente Zellen und immunologische Gedächtniszellen sind also einerseits normaler Bestandteil des zirkulierenden Blutes, andererseits können sie nach Antigenkontakt zum Ausgangspunkt der *L y m p h o z y t o p o e s e* werden (28). Die Transformation zu proliferierenden Blasten erfolgt in der Regel nicht im Blut selbst, sondern in bestimmten Bereichen der lymphatischen Organe und an Orten mit erhöhter Antigenkonzentration.

Der Anteil proliferierender Zellen im Blut wurde auch bei uns bei der in vitro- Markierung mit  $^3\text{H}$ -Thymidin verschwindend gering gefunden. Dagegen kann in den lymphatischen Organen mittels proliferationskinetischer Untersuchungen mehr oder weniger starke Zellneubildung festgestellt werden (11, 48, 51). Mit Hilfe von  $^3\text{H}$ -Thymidin-Markierung, Mitoseindex und mikrospektrometrischer Messung des DNS-Gehaltes werden je nach Funktionszustand 0,5 - 10 % aller lymphatischer Zellen des Lymphknotens in Proliferation gefunden (12, 13, 44, 72, 74). Dabei weisen alle proliferierenden Zellen die morphologischen Merkmale großer und mittelgroßer Lymphozyten oder typischer Blasten auf. Die Generationszeit dieser Zellen kann beim Menschen auf ca. 10 - 24 Stunden geschätzt werden (34, 57, 62, 73). Dabei entfällt etwa die Hälfte der Zellzykluszeit auf die DNS-Synthesephase (35, 52, 60, 61, 62), ca. 2 Stunden auf die praemitotische Ruhephase (34, 62) und auf die Mitosephase ca. 30 Minuten (71). Eine entsprechende Zeitdauer für die  $G_2$ -plus M-Phase von ca. 3 Stunden konnte auch bei uns bis zum Auftreten der ersten markierten Blut-

lymphozyten bei unseren Umsatzkinetischen Untersuchungen nachgewiesen werden. Darüberhinaus ergeben sich an Hand unserer Befunde Hinweise auf eine Durchgangszeit durch das Vorläuferkompartiment von ca. 2 - 3 Tagen. Diese Zeit ist annähernd mit den 3 - 5 Teilungsschritten, die im proliferierenden Gewebe der sekundären lymphatischen Organe gefunden werden, in Einklang zu bringen.

Insgesamt ist vom Zeitpunkt des Antigenkontaktes bis zur Bildung reifer Effektorzellen eine Dauer von etwa 5 Tagen anzunehmen, wobei für die Transformation ca. 2 Tage benötigt werden.

Etwas andere Verhältnisse werden für die Proliferation im Thymus beschrieben, wo für die Bildung primär immunkompetenter Zellen aus undeterminierten Stammzellen wesentlich mehr Teilungsschritte vermutet werden (35, 39, 40, 41). Die Proliferationsaktivität im Thymus ist beim Jugendlichen höher als in den sekundären lymphatischen Organen, mit zunehmendem Alter kann in der Regel eine starke Rückbildung festgestellt werden. Nach heutiger Auffassung ist diese Thymusinvolution auf die erhebliche regenerative Potenz, die in den primär immunkompetenten Zellen und in den immunologischen Gedächtniszellen enthalten ist, zurückzuführen. Selbst bei stark vermindertem Zustrom von undeterminierten Stammzellen aus dem Thymus reicht sie offensichtlich aus, auch im Alter einen annähernd konstanten Bestand an thymusabhängigen Lymphozyten im Blut zu garantieren.

Dies war in groben Zügen der Versuch einer zusammenfassenden Darstellung der Kinetik normaler Lymphozyten,

wie sie sich aus der Kombination unserer Befunde mit den Ergebnissen aus der Literatur ableiten läßt. Für alle zellkinetischen Untersuchungen des lymphatischen Systems stellen diese Normalbefunde eine Basis dar, auf der krankhafte Veränderungen erkannt und beurteilt werden können. Erst durch die Möglichkeit, abweichendes kinetisches Verhalten exakt zu definieren, ist dieses Verfahren geeignet, die pathophysiologischen Erkenntnisse über lymphatische Erkrankungen zu erweitern.

An einem Beispiel soll abschließend kurz demonstriert werden, wie durch Anwendung der zellkinetischen Betrachtungsweise neue Aspekte in der Beurteilung krankhafter Störungen aufgezeigt werden können.

Die Lymphogranulomatose wurde bisher vor allem als Krankheit mit unilokulärer Manifestation und systemischer Ausbreitung angesehen. Zellkinetische Untersuchungen, die von SCHICK et. al. (58) an Patienten mit Morbus Hodgkin durchgeführt wurden, zeigten jedoch Veränderungen des kinetischen Verhaltens von Blutlymphozyten, die eher an eine totale Umstimmung des lymphatischen Systems, also an eine primäre lymphatische Systemerkrankung denken lassen. So konnte eine gegenüber dem Normalen gesteigerte Neubildung von Blutlymphozyten bei gleichzeitig zunehmender Lymphozytopenie nachgewiesen werden. Die Erklärung dafür ist die veränderte Zusammensetzung der neugebildeten Zellen, die fast ausschließlich aus kurzlebigen Lymphozyten mit einer mittleren Lebensdauer von 1 - 5,5 Tagen bestehen, während gleichzeitig der Zustrom langlebiger Zellen vermindert ist. Entsprechend

ist der Bestand an langlebigen Zellen sehr stark reduziert; dieses Defizit kann durch die gesteigerte Produktion kurzlebiger Zellen nicht ausgeglichen werden. Die migrationskinetischen Untersuchungen ergaben bei Patienten ohne Splenomegalie eine qualitativ ungestörte Rezirkulation bei annähernd normalen Speicherrelationen, wobei die Größe des gesamten rezirkulierenden Speichers parallel zur Lymphozytopenie jedoch verringert war.

All diese Befunde zeigen, daß bei Patienten mit Morbus Hodgkin das gesamte lymphatische System in Form einer grundlegenden Änderung des Lymphozytenumsatzes reagiert, die Lymphogranulomatose also aus zellkinetischer Sicht als lymphatische Systemerkrankung definiert werden muß.

Da die Definition des Atypischen auf der genauen Kenntnis des Typischen und dessen Variationsbreite beruht, kann eine solche Änderung, ebenso wie alle bisher gefundenen zellkinetischen Abweichungen, aber nur als bewiesen gelten, wenn ein breites Spektrum an Normalbefunden zum Vergleich zur Verfügung steht.

Diese Arbeit sollte dazu einen Beitrag leisten.

## ZUSAMMENFASSUNG

Durch Retransfusion autologer in vitro mit  $^3\text{H}$ -Cytidin markierter Blutlymphozyten und nachfolgender Beobachtung im Blut wurde bei zwei Patienten mit soliden Tumoren und einer Patientin mit Sklerodermie versucht, Aufschlüsse über Verteilung von Blutlymphozyten und Zellspeichergrößen zu gewinnen. Außerdem wurden bei einer weiteren Patientin, die ebenfalls einen soliden Tumor aufwies, Untersuchungen über Neubildung, Elimination und Lebensdauer von Blutlymphozyten durchgeführt.

Diese Umsatzbestimmungen erfolgten mittels 3-tägiger Dauerinfusion von  $^3\text{H}$ -Thymidin, das in proliferierende Zellen eingebaut wird und die Erfassung neugebildeter Lymphozyten ermöglicht.

Beide Untersuchungen sollten normale Vergleichsbefunde für zellkinetische Befunde bei Erkrankungen des lymphatischen Systems liefern.

Im ersten migrationskinetischen Teil der Arbeit stellten wir fest, daß nach einer raschen intravasalen Verteilung 75 bis 91 % der markierten kleinen und 70 bis 75 % der markierten kleinen plus mittelgroßen zirkulierenden Lymphozyten das Blut mit einer Halbwertszeit von 12 bis 22 Minuten verlassen - sie rezirkulieren. Rezirkulierende Zellen halten sich demnach durchschnittlich 17 bis 32 Minuten im Blut auf und stehen im Austausch mit einem rezirkulierenden Gesamtspeicher, der normalerweise etwa 25 bis 35 mal so groß wie der

zirkulierende Lymphozytenspeicher ist. Dieser rezirkulierende Speicher umfaßt etwa  $2 \text{ bis } 3,5 \times 10^9$  Zellen pro kg Körpergewicht. Eine wichtige Rolle der Milz für die Rezirkulation kann an Hand unserer Befunde vermutet werden.

Pro  $\mu\text{l}$  Blut wurde bei der von uns untersuchten Patientin eine Neubildungsrate von täglich 22 neugebildeten Lymphozyten gefunden. Der größte Teil, nämlich 20 Zellen/ $\mu\text{l}$  Blut/Tag, sind kurzlebige Lymphozyten, die mit einer Halbwertszeit von 9,4 Tagen wieder aus dem Blut eliminiert werden. Diese sich rasch umsetzenden Lymphozyten gehörten überwiegend der morphologischen Klasse der großen und mittelgroßen Lymphozyten an. Etwa ein Zehntel der täglich neugebildeten Blutlymphozyten, nämlich 2/ $\mu\text{l}$  Blut/Tag sind langlebige kleine und mittelgroße Lymphozyten, für die sich eine mittlere Lebensdauer von 1100 Tagen bestimmen läßt. Umgerechnet auf den gesamten Blutlymphozytenspeicher, einschließlich rezirkulierendem Speicher, muß eine tägliche Neuproduktion von  $4,8 \text{ bis } 5,5 \times 10^6$  kurzlebigen und  $1,8 \text{ bis } 3,2 \times 10^6$  langlebigen Lymphozyten angenommen werden.

Am Schluß dieser Arbeit wird versucht, an Hand der von uns gefundenen Daten und Zusammenhänge und der bisher in der Literatur beschriebenen Befunde eine kurze Gesamtdarstellung der Zellkinetik im normalen lymphatischen System zu erarbeiten.

# LITERATURVERZEICHNIS

1. ATHENS, J.W., HAAB, O.P., RAAB, S.O., MAUER, A.M., ASHENBRUCKER, H., CARTWRIGHT, G.E., and WINTROBE, M.M.: Leukokinetic studies IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. J.clin. Invest. 40: 989 - 995 (1961)
2. BEGEMANN, H.: Die Splenektomie bei Lymphogranulomatose - (Hodgkin -) kranken. Med. Klin. 70: 591 - 598 (1975)
3. BEGEMANN, H. und H.-G. HARWERTH : Praktische Hämatologie G.Thieme Verlag, Stuttgart 1971
4. BEGEMANN, H., RASTETTER, J. und W. KABOTH: Klinische Hämatologie. G. Thieme Verlag, Stuttgart 1972
5. BOSMAN, C. and FELDMAN, J.D.: Cytology of immunologic memory. A morphologic study of lymphoid cells during the anamnestic response. J.Exp.Med. 128: 293 - 307 (1968)
6. BREMER, K. and FLIEDNER, T.M.: RNA metabolism of circulating lymphocytes studied in man after autotransfusion and in vitro <sup>3</sup>H-cytidine labeling. Acta Haemat. 45: 181 (1971)
7. BREMER, K., FLIEDNER, T.M. and SCHICK, P.: Kinetic differences of autotransfused <sup>3</sup>H-cytidine labeled blood lymphocytes in leukemic and non-leukemic lymphoma patients. Europ. J. Cancer 9: 113 - 124 (1975)

8. BREMER, K., SCHICK, P., WACK, O., THEML, H., BRASS, B. und HEIMPEL, H.: Rezirkulation von Lymphozyten bei Patienten mit malignen lymphatischen Systemerkrankungen. Blut 24: 215 - 225 (1972)
9. BUCKTON, K.E., SMITH, P.G. and COURT BROWN, W.M.: The estimation of lymphocyte lifespan from studies on males treated with X-rays for ankylosing spondylitis. In: Evans, H.J., Court Brown, W.M. and McLean, A.S. (Editor): Human Radiation Cytogenics, pp. 106 - 114, Amsterdam: North Holland 1967
10. CAFFREY, R.W., RIEKE, W.O. and EVERETT, N.B.: Radioautographic studies of small lymphocytes in the thoracic duct of the rat. Acta Haemat. 28: 145 - 154 (1962)
11. CLARKSON, B., STRIFE, A., FRIED, J., SAKAI, Y., OTA, K., OKITA, T. and MASUDA, R.: Studies of cellular proliferation in human leukemia. IV Behavior of normal hematopoietic cells in 3 adults with acute leukemia given continuous infusions of  $^3\text{H}$ -thymidine for 8 or 10 days. Cancer 26: 1 - 19 (1970)
12. COOPER, E.H., PECKHAM, M.J., MILLARD, R.E., HAMLIN, J.M.E. and GERHARD-MARCHANT, R.: Cell proliferation in human malignant lymphomas. Europ. J. Cancer 4: 287 - 296 (1968)
13. COTTIER, H., KEISER, G., ODARTCHENKO, N., HESS, M. and STONER, R.D.: De novo formation and rapid growth of germinal centers during secondary antibody responses to tetanus toxoid in mice. In: Cottier, H., Odartchenko, N., Schindler, R. and Congdon, C.C. (Editors): Germinal Centers in Immune Responses, pp. 270 - 276, Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967

- (Editors): Germinal Centers in Immune Responses, pp. 270 - 276, Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967
14. CRONKITE, E.P. and FLIEDNER, T.M.: Granulocytopoiesis. The New England Journal of Medicine 270: 1347 (1964)
  15. CRONKITE, E.P., JANSEN, C.R., COTTIER, H., RAI, K.R. and SIPE, C.R.: Lymphocyte production measured by extracorporeal irradiation, cannulation and labeling techniques, Ann. N.Y. Acad. Sci. 113: 566 - 577 (1964)
  16. CUTTNER, J., CRONKITE, E.P., KESSE, M. and FLIEDNER, T.M.: Behavior of autotransfused in vitro  $^3\text{H}$ -cytidine ( $^3\text{H}$ -CDR) - labeled lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia (CLL). J.Clin. Invest. 43: 1236 (1964)
  17. FIELD, E.O., SHARPE, H.B.A., DAWSON, K.B., ANDERSEN, V., KILLMANN, S.A. and WEEKE, E.: Turnover rate of normal blood lymphocytes and exchangeable pool size in man, calculated from analysis of chromosomal aberrations sustained during extracorporeal irradiation of the blood. Blood 39: 39 - 56 (1972)
  18. FLIEDNER, T.M.: Kinetik und Regulationsmechanismen des Granulozytenumsatzes. Schweiz. Med. Wochenschrift 89: 1061 (1959)
  19. FLIEDNER, T.M.: Experimental studies in PHA-stimulated lymphocytes and autotransfusion of  $^3\text{H}$ -cytidine labeled lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia. In Yoffey, J.M. (Editor): The Lymphocyte in Immunology and Haemopoiesis, pp. 198 - 206, London: Arnold (1967)
  20. FLIEDNER, T.M.: Lymphozyt - Lymphozyt? Verh. d. dt. Ges. f. Inn. Med. 79: 129 - 137 (1973)

21. FORD, W.L.: The kinetics of lymphocyte recirculation within the rat spleen. *Cell Tiss. Kinet.* 2: 171 - 191 (1969)
22. FORD, W.L. and GOWANS, J.L.: The traffic of lymphocytes. *Semin. Hemat.* 6: 67 - 83 (1969)
23. FORD, W.L. and NIEUWENHUIS, P.: The spleen and lymphocytes. *Schweiz. Med. Wschr.* 104: 1348 - 1351 (1974)
24. FORD, W.L. and SIMMONDS, S.J.: The tempo of recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. *Cell Tiss. Kinet.* 5: 175 - 189 (1972)
25. GIRARDET, R.E. and BENNINGHOFF, D.L.: Thoracic duct lymph and lymphocyte studies in man using a thoracic duct "side-fistula". *Cancer* 29: 666 - 669 (1972)
26. GOWANS, J.L.: The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. *J. Physiol.* 146: 54 - 69 (1959)
27. GOWANS, J.L. and KNIGHT, E.J.: The route of recirculation of lymphocytes in the rat. *Proc. R. Soc.* 159: 257 - 282 (1964)
28. GOWANS, J.L. and MCGREGOR, D.D.: The immunological activities of lymphocytes. *Progr. Allergy* 9: 1 - 78 (1965)
29. GOWANS, J.L., MCGREGOR, D.D., COWEN, D.M. and FORD, C.E.: Initiation of immune responses by small lymphocytes. *Nature (London)* 196: 651 - 655 (1962)

30. GOWANS, J.L. and UHR, J.W.: The carriage of immunological memory by small lymphocytes in the rat. *J. Exp. Med.* 124: 1017 - 1030 (1966)
31. HELTZEL, W.: Autoradiographische Untersuchungen zur Kinetik der Mono- und Granulozyten bei chronischer lymphatischer Leukämie. Inaugural-Dissertation, München 1975.
32. HERSEY, P.: The separation and <sup>51</sup>chromium labeling of human lymphocytes with in vivo studies of survival and migration. *Blood* 38: 360 - 371 (1971)
33. HOWARD, J.C., HUNT, S.V. and GOWANS, J.L.: Identification of marrow-derived and thymus-derived small lymphocytes in the lymphoid tissue and thoracic duct lymph of normal rats. *J. Exp. Med.* 135: 200 - 219 (1972)
34. JOHNSON, L.J., LOBUE, J., CHAN, P.C., MONETTE, F.C., RUBIN, A.D., GORDON, A.S. and DAMESHEK, W.: Autoradiographic studies of human lymphocytes cultured in vivo. *Proc. Soc. Exp. Med.* 130: 675 - 697 (1969)
35. KOLLER, P.C., DAVIES, A.J.S., LEUCHARS, E. and WALLIS, V.: Studies on thymus grafts in irradiated mice: Repopulation of the graft. In: Yoffey, J.M. (Editor): *The Lymphocyte in Immunology and Haemopoiesis*, pp. 342 - 349, London: Arnold 1967
36. MANASTER, J., FRÜHLING, J. and STRYCKMANS, P.: Kinetics of lymphocytes in chronic lymphatic leukemia. I. Equilibrium between blood and a "readily accessible pool". *Blood* 41: 425 - 438 (1973)

37. MARSHALL, W.H., VALENTINE, F.T. and LAWRENCE, H.S.: Cellular immunity in vitro. Clonal proliferation of antigen-stimulated lymphocytes. J. Exp. Med. 130: 327 - 342 (1969)
38. MCGREGOR, D.D., KOSTER, F.T. and MACKANESS, G.B.: The mediator of cellular immunity. I. The life-span and circulation of the immunologically committed lymphocyte. J. Exp. Med. 133: 389 - 399 (1971)
39. METCALF, D. and WAKONIK-VAARTAJA, R.: Stem cell replacement in normal thymus grafts. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 115: 731 - 735 (1964)
40. METCALF, D. and WIADROWSKI, M.: Autoradiographic analysis of lymphocyte proliferation in the thymus and in thymic lymphoma tissue. Cancer Res. 26: 483 - 491 (1966)
41. MICHALKE, W.D., HESS, M.W., RIEDWYL, H, STONER, R.D. and COTTIER, H.: Thymic lymphopoiesis and cell loss in newborn mice. Blood 33: 541 - 554 (1969)
42. MILLER, J.J.III: Studies of nonmigrating long-lived lymphocytes in rats. V. Presence and reactions to antigens after neonatal thymectomy-Cellular Immunol. 3: 413 - 419 (1973)
43. MITCHELL, J.: Lymphocyte circulation in the spleen. Marginal zone bridging channels and their possible role in cell traffic. Immunology 24: 93 - 107 (1973)

44. MITCHELL, J, McDONALD, W. and NOSSAL, G.J.V.:  
Autoradiographic studies on the immune response.  
3. Differential lymphopoiesis in various organs.  
Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. 41: 411 - 421  
(1963)
45. NADLER, S.B., HIDALGO, J.U. and BLOCH, T.: Pre-  
diction of blood volume in normal human adults.  
Surgery, St.Louis 51: 224 - 232 (1982)
46. NORMAN, A., SASAKI, M.S., OTTOMAN, R.E. and  
FINGERHUT, A.G.: Lymphocyte lifetime in women.  
Science 147: 745 (1965)
47. NOSSAL, G.V.J., SHORTMAN, K.D., MILLER, J.F.A.P.,  
MITCHELL, G.F. and HASKILL, J.S.: The target cell  
in the induction of immunity and tolerance. Cold  
Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. 32: 369 - 379  
(1967)
48. OSOGOE, B., MONDEN, Y. and ITO, H.: Etude quanti-  
tative de la production cellulaire par la système  
thymolymphatic du rat. Sang 28: 729 - 737 (1957)
49. PABST, R. and TREPEL, F.: The predominant role of  
the spleen in lymphocyte recirculation - homing  
of lymphocytes to and release from the isolated  
perfused pig spleen. Cell Tissue Kinet. 8: 529 -  
541 (1975)
50. PABST, R. and TREPEL, F.: The predominant role of  
the spleen in lymphocyte recirculation. II. Pre-  
and post-splenectomy retransfusion studies in  
young pigs. Cell Tissue Kinet. (1976)

51. PABST, R. and TREPEL, F.: Lymphocytopoiesis in vitro. Production of small lymphocytes and plasma cells in the isolated perfused spleen.
52. PAPPAS, A., LENNARTZ, K.J., SCHEURLEIN, P.G. und FREYBERGER, H.: Proliferationskinetik phytohämagglutinin-stimulierter Lymphozyten von Patienten mit chronischer Lymphadenose und Lymphogranulomatose. Med. Welt 22: 123 - 127 (1971)
53. REVILLARD, J.P., BROCHIER, J., DURIX, A., BERNHARDT, J.P., BRYON, P.A., ARCHIMBAUD, J.P., FRIES, D. et TRAEGER, J.: Drainage du canal thoracique avant transplantation chez des malades atteints d'insuffisance rénale chronique. Nouv. Rev. Franc. Hémat. 8: 585 - 601 (1968)
54. ROBINSON, S.H., BRECHER, G., LOURIE, J.S. and HALEY, J.E.: Leukocyte labeling in rats during and after continuous infusion of tritiated thymidine: Implications for lymphocyte longevity and DNA reutilization. Blood 26: 281 - 295 (1965)
55. SARLES, H.E., REMMERS, A.R., FISH, J.C., CANALES, C.O., THOMAS, F.D., TYSON, K.R.T., BEATHARD, G.A. and RITZMANN, S.E.: Depletion of lymphocytes for the protection of renal allografts. Arch. Intern. Med. 125: 445 - 450 (1970)
56. SARLES, H.E., SMITH, G.H., FISH, J.C. and REMMERS, A.R.Jr.: Observations concerning human lymphocyte homeostasis during prolonged thoracic duct lymph diversion. Texas Rep. Biol. Med. 25: 573 - 583 (1967)

57. SCHICK, P., TREPEL, F. and BEGEMANN, H.: On the fate of DNA synthetizing lymphoid blood cells in Hodgkin's disease. Scand. J. Haemat. 14: 17 - 23 (1975)
58. SCHICK, P., TREPEL, F., BENEDEK, S., TRUMPP, P., KABOTH, W., BEGEMANN, H. and FLIEDNER, T.M.: Kinetics of lymphocytes in Hodgkin's disease. Blood 27: 223 - 235 (1973)
59. SCHICK, P., TREPEL, F., LEHMANN-BROCKHAUS, E. and NIETMANN, H.: Autotransfusion of <sup>3</sup>H-cytidine-labelled blood lymphocytes in patients with Hodgkin's disease and Non-Hodgkin's patients. I. Limitations of the method. Acta Haemat. 53: 193 - 205 (1975)
60. SCHIFFER, L.M.: Human lymphocyte proliferation. DNA synthesis time. Cell Tissue Kinet. 4: 585 - 595 (1971)
61. SCHIFFER, L.M.: Observations on the in-vitro measurement of human lymphocyte DNA synthesis time. Cell Tissue Kinet. 4: 597 - 599 (1971)
62. SMITH, H., MURRAY, D. and GÜCKEN, M.: Life cycle of lymphoid cells in vitro. Europ. J. Cancer 6: 269 - 271 (1970)
63. SOUSA, M.A.B., de: Reticulum arrangement related to the behaviour of cell populations in the mouse lymph node. In: Fiore-Donati, L. and Hanna, M.G.Jr. (Editors): Lymphatic Tissue and Germinal Centers in Immune Response, pp. 49 - 56, New York: Plenum Press 1969

64. SPRENT, J.: Circulating T and B lymphocytes of the mouse. I. Migratory properties. Cellular Immunol. 7: 10 - 39 (1973)
65. STJERNSWÄRD, J., JONDAL, M., VANKY, F., WIGZELL, H. and SEALA, R.: Lymphopenia and change in distribution of human B and T lymphocytes in peripheral blood induced by irradiation for mammary carcinoma. Lancet 1972/I, 1352 - 1356
66. STROBER, S.: Initiation of antibody responses by different classes of lymphocytes. V. Fundamental change in the physiological characteristics of virgin thymus-independent ("B") lymphocyte and "B" memory cells. J. Exp. Med. 136: 851 - 871 (1972)
67. STRYCKMANS, P.A., CHANANA, A.D., CRONKITE, E.P., GREENBERG, M.L. and SCHIFFER, L.M.: Studies on lymphocytes IX. The survival of autotransfused labelled lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia. Europ. J. Cancer 4: 241 - 246 (1968)
68. THEML, H., TREPEL, F., SCHICK, P., KABOTH, W. and BEGEMANN, H.: Kinetics of lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia: Studies using continuous <sup>3</sup>H-thymidine infusion in two patients. Blood 42: 623 - 636 (1973)
69. TILNEY, N.L. and MURRAY, J.E.: Chronic thoracic duct fistula: operative technic and physiologic effects in man. Ann. Surg. 167: 1 - 8 (1968)

70. TYLER, R.W. and EVERETT, N.B.: Radioautographic study of cellular migration using parabiotic rats. Blood 39: 249 - 266 (1972)
71. WAGNER, H.P. and ECKMANN, L.: Proliferative characteristics of thoracic duct lymphoid cells in man. XIIIth International Congress of Hematology, Munich, August 1970 (Abstract)
72. WERDELIN, O., FOLEY, P.S., ROSE, N.R. and McCLUSKEY, R.T.: The growth of cell population in the draining popliteal lymph node of rats injected with rat adrenal in Freund's adjuvant. Immunology 21: 1059 - 1063 (1971)
73. WILSON, J.D. and THOMSON, A.E.R.: Death and division of lymphocytes. Neglected factors in assessment of PHA-induced transformation. Lancet 1968/II, 1120 - 1123
74. WINKELSTEIN, A. and CRADDOCK, C.G.: Comparative response of normal human thymus and lymph node cells to phytohemagglutinin in culture. Blood 29: 594 - 607 (1967)
75. YONEMOTO, R.H. and TERASAKI, P.J.: Cancer immunotherapy with HLA-compatible thoracic duct lymphocyte transplantation. A preliminary report. Cancer 30: 1438 - 1443 (1972)



Ich danke Herrn Professor Dr. Begemann für die Überlassung dieser Arbeit und für die Möglichkeit, die Einrichtungen des Hämatologischen Labors seiner Klinik zu benutzen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. P. Schick für die Unterstützung bei der technischen Durchführung der Experimente. Die zahlreichen Diskussionen, die ich mit ihm führen konnte, waren mir eine wesentliche Hilfe bei der Einarbeitung in die Thematik.



LEBENS LAUF

Name: Marianne M a t z n e r

Geboren: 3. September 1945

Geburtsort: Memmingen

Vater: Martin M a t z n e r, Dr.med., prakt.Arzt  
1945 gefallen

Mutter: Dorothea M a t z n e r, geb. Pradel,  
Fürsorgerin, verstorben April 1975

Schulbildung: 1951 - 1956 5 Klassen Volksschule  
Landsberg  
1956 - 1965 9 Klassen naturwissenschaft-  
liches Gymnasium, Dachau

Prüfungen: 1965 Reifeprüfung  
1966 Einstellungsprüfung an der  
Bayer.Staatsbibliothek,  
München  
1968 Diplomprüfung an der Bayer.  
Staatsbibliothek  
1970 April naturwiss. Vorprüfung  
1971 Oktober ärztliche Vorprüfung  
1975 Juni Staatsexamen Humanmedizin

Berufliche 1965 Oktober bis  
Tätigkeiten: 1966 Juli Angestellte der Bayer.  
Staatsbibliothek München  
1968 Oktober bis  
1969 März Diplombibliothekarin an der  
Bayer. Staatsbibliothek

Studium: 1969 Sommersemester  
Beginn des medizinischen  
Studiums  
24. Juni 1975 Beendigung des Studiums  
mit dem Staatsexamen





